Rapport hebdomadaire des maladies au Canada

ISSN 0382-232X

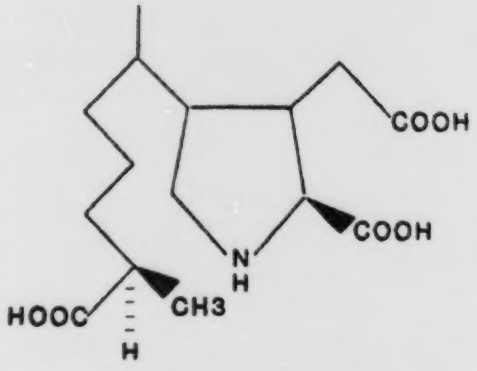
Date de publication: Septembre 1990 Vol. 16S1F

Supplément

Compte rendu du symposium sur

L'INTOXICATION PAR L'ACIDE DOMOÏQUE

Ottawa (Ontario)
les 11 et 12 avril 1989



Santé et Bien-être social Canada
Health and Welfare Canada

Canada

Compte rendu du symposium sur

L'INTOXICATION PAR L'ACIDE DOMOÏQUE

Ottawa (Ontario)

les 11 et 12 avril 1989

Organisé par
le Laboratoire de lutte contre la maladie
et la Direction des aliments,
Protection de la santé,
Santé et Bien-être social Canada

Comité organisateur:
I. Hynie, président
E.C.D. Todd, H.B.S. Conacher

Rédacteurs: I. Hynie, E.C.D. Todd

91-04517/

Participants

L. Bédard
Bureau régional des maladies infectieuses
980, rue Guy, Bureau 300A
Montréal (Québec)
H3H 2K3

C.J. Bird
Conseil national de recherches
1411, rue Oxford
Halifax (Nouvelle-Écosse)
B3H 3Z1

R. Bose
Department of Pharmacology and Therapeutics,
and Department of Surgery
Faculty of Medicine, University of Manitoba
770 Bannatyne Avenue
Winnipeg, Manitoba
R3E 0W3

S. Carpenter
Institut neurologique de Montréal
Université McGill, 3801, rue Université
Montréal (Québec)
H3A 2B4

G. Debonnel
Unité de neurobiologie psychiatrique
Département de psychiatrie
Université McGill
1033 Ouest, Avenue des Pins
Montréal (Québec)
H3A 1A1

C.J. Dechesne
Laboratory of Molecular Otology
National Institute on Deafness and
Communication Disorders
Bethesda, Maryland 20892
U.S.A.

A.C. Evans
Laboratoires d'imagerie à positons
Centre McConnell d'imagerie du cerveau
Institut neurologique de Montréal
Université McGill, 3801, rue Université
Montréal (Québec)
H3A 2B4

A.S.W. de Freitas
Conseil national de recerches
1411, rue Oxford
Halifax (Nouvelle-Écosse)
B3H 3Z1

A. Gjedde
Laboratoires d'imagerie à positons
Centre McConnell d'imagerie du cerveau
Institut neurologique de Montréal
Université McGill, 3801, rue Université
Montréal (Québec)
H3A 2B4

G.B. Glavin
Department of Surgery
Faculty of Medicine
University of Manitoba
770 Bannatyne Avenue
Winnipeg, Manitoba
R3E 0W3

D.R. Hampson
Faculty of Pharmacy
University of Toronto
19 Russell Street
Toronto, Ontario
M5S 2S2

L. Hanic
Department of Biology
University of Prince Edward Island
Charlottetown, Prince Edward Island
C1A 4P3

J. Hockin
Divison de l'épidémiologie régionale
Laboratoire de lutte contre la maladie
Santé et Bien-être social Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0L2

I. Hynie
Bureau de biochimie médicale
Laboratoire de lutte contre la maladie
Santé et Bien-être social Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0L2

F. Iverson
Bureau d'innocuité des produits chimiques
Direction des aliments
Direction générale de la protection de la santé
Santé et Bien-être social Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0L2

G. R. Johnson
Atlantic Veterinary College
University of Prince Edward Island
Charlottetown, Prince Edward Island
C1A 4P3

I. Judson
Prince Edward Island Department of Fisheries
and Aquaculture
P.O. Box 2000
Charlottetown, Prince Edward Island
C1A 7N8

J. Kispert
Laboratory for Molecular Biology
National Institute of Neurological Diseases and Stroke
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland 20892
U.S.A.

T. Kosatsky
Bureau régional pour l'hygiène du milieu
5565, rue Sherbrooke East
D.S.C. de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont
Montréal (Québec)
H1N 1A2

J.F. Lawrence
Bureau d'innocuité des produits chimiques
Direction des aliments
Direction générale de la protection de la santé
Santé et Bien-être social Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0L2

A.J. Liston
Sous-ministre adjoint
Direction générale de la protection de la santé
Santé Bien-être social Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0L2

J. McDonald
Playfair Neuroscience Unit, Room 11-417
Toronto Western Hospital
399 Bathurst Street
Toronto, Ontario
M5T 2S8

L.A. McNutt
Department of Preventive Medicine
University of Iowa
Iowa City, Iowa 52242
U.S.A.

C. de Montigny
Unité de neurobiologie psychiatrique
Département de psychiatrie
Université McGill
1033 Ouest, Avenue des Pins
Montréal (Québec)
H3A 1A1

E.A. Nera
Bureau d'innocuité des produits chimiques
Direction des aliments
Direction générale de la protection de la santé
Santé et Bien-être social Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0L2

P. Nijjar
Atlantic Veterinary College
University of Prince Edward Island
Charlottetown, Prince Edward Island
C1A 4P3

A. Novelli
Laboratory Biophysics
International School for Advanced Studies
Trieste, Italy
and
Laboratory for Molecular Biology
National Institute of Neurological Diseases and Stroke
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland 20892
U.S.A.

J. W. Olney
Department of Psychiatry
Washington University School of Medicine
St. Louis, Missouri 63100
U.S.A.

T.M. Perl
Division de l'épidémiologie régionale
Laboratoire de lutte contre la maladie
Bureau régional des maladies infectieuses
980, rue Guy, Bureau 300A
Montréal (Québec)
H3H 2K3

C. Pinsky
Department of Pharmacology and Therapeutics,
and Department of Surgery
Faculty of Medicine, University of Manitoba
770 Bannatyne Avenue
Winnipeg, Manitoba
R3E 0W3

M.A. Quilliam
Conseil national de recherches
1411, rue Oxford
Halifax (Nouvelle-Écosse)
B3H 3Z1

A. Reilly
Laboratory for Molecular Biology
National Institute of Neurological Diseases and Stroke
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland 20892
U.S.A.

R.S. Remis
Bureau régional des maladies infectieuses
980, rue Guy, Bureau 300A
Montréal (Québec)
H3H 2K3

A. Tasker
Atlantic Veterinary College
University of Prince Edward Island
Charlottetown, Prince Edward Island
C1A 4P3

J. Teitelbaum
Service de réanimation
Hôpital Royal Victoria
687, avenue West Pine
Montréal (Québec)
H3A 1A1

E.C.D. Todd
Bureau de dangers microbiens
Direction des aliments
Direction générale de la protection de la santé
Santé et Bien-être social Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0L2

J. Truelove
Bureau d'innocuité des produits chimiques
Direction des aliments
Direction générale de la protection de la santé
Santé et Bien-être social Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0L2

L. Tryphonas
Bureau d'innocuité des produits chimiques
Direction des aliments
Direction générale de la protection de la santé
Santé et Bien-être social Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0L2

M. Weiss
Faculté des sciences de Luminy
Université Aix-Marseille 2
France

R.J. Wenthold
Laboratory of Molecular Otology
National Institute on Deafness and
Communication Disorders
Bethesda, Maryland 20892
U.S.A.

J.L.C. Wright
Conseil national de recherches
1411, rue Oxford
Halifax (Nouvelle-Écosse)
B3H 3Z1

R.J. Zatorre
Institut neurologique de Montréal
Université McGill, 3801, rue Université
Montréal (Québec)
H3A 2B4

V. Zitko
Marine Chemistry Division
Biological Station
St. Andrews, New Brunswick
E0G 2X0

Table des matières

Page

1. **Discours d'accueil au symposium sur la toxicité de l'acide domoïque**
   A.J. Liston 1

2. **Chronologie de l'épidémie d'intoxication par les moules**
   E.C.D. Todd 3

3. **Présentation cllinique de l'intoxication aiguë par l'acide domoïque: Observations de cas**
   J. Teitelbaum 5

4. **Intoxication amnésiante par les coquillages: nouveau syndrome clinique attribuable à l'acide domoïque**
   T.M. Perl, L. Bédard, T. Kosatsky, J. Hockin, E.C.D. Todd, L.A. McNutt, et R.S. Remis 7

5. **Séquelles neurologiques de l'intoxication à l'acide domoïque**
   J. Teitelbaum, R.J. Zatorre, S. Carpenter, D. Gendron, et N.R. Cashman 9

6. **Toxicologie de l'acide domoïque administré par voie générale à des rongeurs et des primates**
   F. Iverson, J. Truelove, L. Tryphonas, et E.A. Nera 15

7. **Chimie, biologie et toxicologie de l'acide domoïque et de ses isomères**
   J.L.C. Wright, C.J. Bird, A.S.W. de Freitas, D.R. Hampson, J. McDonald, et M.A. Quilliam 21

8. **Mesure de l'acide domoïque dans les fruits de mer et dans les tissus et les fluides biologiques**
   J.F. Lawrence 27

9. **La culture des moules et l'accumulation de l'acide domoïque**
   G.R. Johnson, L. Hanic, I. Judson, P. Nijjar, et A. Tasker 33

10. **Discussion du groupe d'experts: Faits qui incriminent l'acide domoïque comme la cause de l'épidémie de 1987**
    I. Hynie, J. Hockin, J.L.C. Wright, et F. Iverson 37

11. **Discussion du groupe d'experts: Définition du syndrome**
    T.M. Perl, J. Teitelbaum, J. Hockin, et E.C.D. Todd 43

12. **L'excitatoxicité: Vue d'ensemble**
    J.W. Olney 49

13. **Neurotoxicité de l'acide domoïque: Médiation par le récepteur du kaïnate – Étude electrophysiologiques chez le rat**
    G. Debonnel, M. Weiss, et C. de Montigny 63

14. **Caractérisation moléculaire d'un récepteur supposé de l'acide kaïnique**
    D.R. Hampson, C.J. Dechesne, et R.J. Wenthold 75

15. **Neuropathologie humaine de l'intoxication encéphalopathique par une toxine des moules**
    S. Carpenter 79

16. **Neuropathologie de l'intoxication expérimentale par l'acide domoïque chez les rats et les primates non humains**
    L. Tryphonas, J. Truelove, F. Iverson, E.C.D. Todd, et E.A. Nera 81

17. **Toxicité des acides aminés excitateurs pour les grains du cervelet en culture primaire**
    A. Novelli, J. Kispert, A. Reilly, et V. Zitco 89

Page

18. **Modèle expérimental sensible pour l'étude du comportement de souris intoxiquées par les extraits de moules contaminées – Antidotes possibles**
R. Bose, C. Pinsky, et G.B. Glavin 97

19. **Perte de mémoire consécutive à l'intoxication par l'acide domoïque après ingestion de moules toxiques**
R.J. Zatorre 107

20. **Intoxication par l'acide domoïque chez les humains: Destruction excitotoxique des voies glutamatergiques du cerveau mise en évidence par la mesure du métabolisme du glucose au moyen de la tomographie à positons (TP)**
A. Gjedde et A.C. Evans 111

21. **Effets gastro-intestinaux de moules contaminées et antidotes possibles**
G.B. Glavin, C. Pinsky, et R. Bose 117

22. **Discussion du groupe d'experts: traitement**
J.W. Olney, J. Teitelbaum, C. Pinsky, et G. Debonnel 123

23. **Discussion du groupe d'experts: priorités de recherche à brève échéance**
F. Iverson, C. Pinsky, et J.L.C. Wright 127

1. *Discours d'accueil au symposium sur la toxicité de l'acide domoïque*

A.J. Liston

Mesdames et messieurs, il me fait plaisir de vous accueillir à Ottawa.

Permettez-moi de dire quelques mots sur l'objet du présent symposium. Comme la plupart d'entre vous le savez, aux mois de novembre et de décembre 1987, une maladie étrange a fait son apparition au Canada, qui fut rapidement attribuée à l'ingestion de moules en provenance de la côte atlantique. Cependant, la présentation clinique de ce nouveau type d'intoxication alimentaire était si différente d'un cas à l'autre que, pendant presque une semaine, les patients furent traités comme des cas individuels, dont le diagnostic était difficile et qui n'avaient pas de lien entre eux. C'est seulement après l'apparition d'un certain nombre de cas à Montréal en l'espace de quelques jours que les médecins commencèrent à penser que l'ingestion de moules pouvait avoir un lien avec la maladie. La Direction générale de la protection de la santé fut alors prévenue de cette possibilité et on constata après analyse que certains extraits de moules étaient toxiques pour les animaux de laboratoire. Il apparut également clairement qu'il s'agissait d'une substance non encore rencontrée en toxicologie humaine.

Des mesures de réglementation mises au point conjointement par Santé et Bien-être social Canada et Pêches et Océans furent proposées pour éviter que la population ne soit exposée à un risque d'intoxication par des fruits de mer. Mais à ce moment-là, nous ne connaissions pas la nature du toxique et devions nous fier à des principes généraux et au bon sens. Des dizaines de spécialistes du Conseil national de recherches, de Pêches et Océans, de Santé et Bien-être social Canada ainsi que de plusieurs universités et hôpitaux, mirent tous leurs efforts en commun et identifièrent la toxine comme étant l'acide domoïque. Mais entre temps, la situation avait été maîtrisée et aucun nouveau cas d'intoxication clinique ne fut signalé.

Ces recherches entreprises en situation d'urgence ont permis de réunir une quantité importante de nouvelles données scientifiques, mais soulèvent également de très nombreuses interrogations. Un certain nombre de projets de recherche complémentaires portent sur quelques-unes de ces préoccupations, et c'est pour nous permettre de faire le bilan de ce que nous avons appris dans les quinze mois qui ont suivi l'incident de 1987 que le présent symposium a été organisé.

Idéalement, nous voudrions que les principes scientifiques et les mesures de réglementation permettent d'atteindre deux objectifs: 1) prévenir toute intoxication future par l'acide domoïque; 2) diagnostiquer et traiter de telles intoxications si les mesures de protection échouent. Comme vous le comprenez sûrement, la principale fonction de la Direction générale de la protection de la santé est de prévenir une maladie avant son apparition. Un tel objectif non seulement nécessite une vigilance constante, sans laquelle aucune mesure préventive ne peut être efficace, mais également des politiques de réglementation sûres qui s'appuient sur des faits scientifiques. Le gouvernement a mis en place des mesures de protection visant à protéger la population canadienne contre d'éventuelles intoxications par l'acide domoïque à partir des fruits de mer, comme celles que nous avons connues en 1987. Mais la réglementation doit suivre les progrès de la science, car c'est par l'amélioration de nos connaissances que nous pourrons garantir la sécurité du consommateur, qui passera toujours en priorité.

Nous savons maintenant que l'acide domoïque est omniprésent en milieu marin; il est bien possible que, dans l'avenir, avec de meilleures méthodes analytiques, nous soyons capables de détecter les traces de cette substance toxique dans d'autres fruits de mer. Il nous faut en apprendre beaucoup plus sur la toxicologie de l'acide domoïque pour décider raisonnablement d'un seuil qui soit acceptable et sans danger pour la population. Nous devons également en apprendre beaucoup plus sur l'évolution de l'acide domoïque dans l'environnement marin pour pouvoir en prédire le moment et le lieu d'accumulation, de sorte que les mesures d'urgence fassent place à une planification méthodique et à une gestion efficace des risques.

Bien sûr, la responsabilité de mettre au point ces mesures préventives sera partagée par les instances responsables de la réglementation des deux ministères concernés: Pêches et Océans, Santé et Bien-être social Canada. Cependant, le problème est d'une telle complexité que ces politiques devront reposer en grande partie sur l'apport de groupes de recherche multidisciplinaires, tel le présent symposium.

Dans le présent symposium, l'accent sera principalement mis sur la deuxième question: comment diagnostiquer et traiter les intoxications par l'acide domoïque si elles se produisent. Bien que nous ayons toutes les raisons de croire qu'un incident du type de celui de 1987 sera évité, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que de nouveaux cas individuels d'intoxication par l'acide domoïque, non nécessairement reliés à la pêche commerciale, ne se reproduisent de façon sporadique, au Canada ou dans d'autres pays, à la suite de circonstances imprévues modifiant la biologie marine. Au fait, nous ne pouvons ni confirmer ni écarter la possibilité que de tels cas individuels, non diagnostiqués, n'aient pas existé dans le passé. L'incident de 1987 a permis d'acquérir une très grande expérience clinique dont il faut faire la synthèse. Nous avons ici, dans cette salle, de nombreux médecins et épidémiologistes qui en ont fait l'expérience directe. Nous avons également invité plusieurs spécialistes ayant joué un rôle important dans l'identification initiale de la toxine, ainsi que des spécialistes de recherches théoriques dans des domaines connexes. Certains des sujets dont vous entendrez parler à ce symposium, peut-être même la plupart d'entre eux, ont déjà été présentés séparément lors de différentes rencontres, mais je pense que, pour la première fois, vous aurez l'occasion de vous en faire une idée d'ensemble.

Le caractère multidisciplinaire de l'auditoire réuni ici permet en outre de traiter de plusieurs questions précises qui ont été choisies comme sujets de table ronde pour les deux prochains jours. Le

premier sujet peut paraître une simple formalité, mais je crois vraiment que nous devons nous assurer une fois de plus que l'acide domoïque fut effectivement la seule cause de l'incident de 1987. Il semble en effet qu'un certain nombre de spécialistes aient encore des doutes à cet égard; il faut donc s'assurer qu'aucun fait pertinent ou même aucune autre hypothèse n'ait été écarté.

Une seconde table ronde est prévue pour réexaminer la définition du syndrome lui-même. Souvenons-nous qu'en 1987 les cliniciens étaient confrontés pour la première fois à une nouvelle maladie et que les épidémiologistes ne pouvaient s'appuyer sur aucune confirmation des cas en laboratoire. Il est très possible qu'avec le recul certains symptômes qui apparurent anodins ou fortuits prendront de l'importance et qu'il faudra un jour recourir à des analyses de laboratoire pour la confirmation des diagnostics.

Que je sache, aucun antidote pleinement efficace contre l'acide domoïque n'a été découvert à ce jour; tout de même, la table ronde sur le traitement nous permettra de réexaminer l'efficacité clinique de la thérapeutique utilisée par les médecins intervenus dans l'incident de 1987, et de comparer ces données empiriques aux découvertes expérimentales des recherches théoriques.

Enfin, nous espérons que les participants à ce symposium reconnaîtront les champs d'étude qui ont été ignorés et qui leur apparaissent essentiels à la poursuite des progrès devant ce syndrome dans les prochaines années.

Je vous souhaite une rencontre pleine de succès.

2. *Chronologie de l'épidémie d'intoxication par les moules*

E.C.D. Todd

Le 22 novembre 1987 deux personnes de Moncton, au Nouveau-Brunswick, sont hospitalisées après avoir présenté une "gastro-entérite" et un état confusionnel. Bien que ces cas ne soient pas reliés entre eux, les symptômes se ressemblaient suffisamment pour que l'on interroge les patients sur ce qu'ils ont mangé. Tous deux ont pris des moules achetées dans deux magasins d'alimentation différents. Le lendemain, on récupère des moules chez l'un des patients et au magasin où il les a achetées. On les expédie à l'unité d'essais biologiques sur des souris de Pêches et Océans, à Black's Harbour.

Le 24 novembre, la Direction générale de la protection de la santé de la région du Québec est informée de deux cas d'intoxication par la Communauté urbaine de Montréal (CUM) et le Département de santé communautaire de Québec. Deux hommes âgés ont présenté des vomissements, un état confusionnel et une perte de mémoire quatre à cinq heures après avoir consommé des moules. Le 25 novembre, la Division des travaux sur le terrain de la Direction générale de la protection de la santé confirme que les moules en provenance soit de l'Île-du-Prince-Édouard (Î.-P.-É.), soit du Maine, ont un lien avec la maladie et que Pêches et Océans en a été informé. Des échantillons de moules provenant de ces deux cas (deux échantillons d'un restaurant et un autre du domicile d'un patient) sont emballés pour être expédiés le 26 novembre aux Laboratoires de recherches à Ottawa en vue d'un essai sur des souris, mais leur expédition est retardée par une tempête de neige. Le lendemain, le directeur du Laboratoire de la Communauté urbaine de Montréal les porte lui-même par la route à Ottawa à des fins d'analyse toxicologique. Bien que les symptômes (confusion et perte de mémoire) dans ces deux cas ne ressemblent pas à ceux de l'intoxication paralysante par les mollusques ou de toute autre forme connue d'intoxication par les fruits de mer, on prend la décision d'injecter des extraits à des souris, afin (1) d'éliminer (ou de confirmer) la possibilité d'une intoxication paralysante par les mollusques et (2) d'assurer qu'aucune autre substance toxique n'est présente. Les extraits sont préparés selon le même protocole que pour l'intoxication paralysante par les mollusques et administrés à deux souris par voie intrapéritonéale pour chaque échantillon. Les deux souris meurent au bout de 15 et 25 minutes, après avoir présenté un état d'excitation caractérisé par une réaction de grattage avec les membres postérieurs qui n'a jamais été observée auparavant. Les résultats sont transmis par téléphone à la CUM et à Pêches et Océans plus tard dans la journée. Le même après-midi, on apprend par Pêches et Océans que l'un des échantillons analysés selon le même protocole à Black's Harbour a provoqué une réaction similaire. D'autre part, ce jour-là, la Direction générale de la protection de la santé est informée de deux nouveaux cas possibles à Charlottetown, Î.-P.-É. On apprendra plus tard que deux personnes âgées ont acheté des moules dans un magasin d'alimentation le 25 novembre et qu'elles les ont mangées à la vapeur arrosées de quelques gouttes de vinaigre. Leur chien en a mangé un peu en même temps; il est le premier à réagir en vomissant à trois reprises. La femme vomit également quelques heures plus tard, mais l'homme en est incapable et tombe dans un état de prostration accompagné de secousses de la tête. Ces personnes consultent leur médecin par téléphone, mais elles sont malades depuis deux jours lorsqu'elles se rendent à l'hôpital le 28 novembre. On recueille des échantillons de moules à leur domicile et aux magasins d'alimentation; on les expédie par avion à Ottawa les 28 et 29 novembre. Ces moules causent la mort des souris dans un délai de 30 minutes, après un grattage typique. Les échantillons de moules provenant de diverses concessions des fleuves Cardigan et Boughton, expédiées en même temps, donnent des résultats variables, allant de l'absence de symptômes à la réaction de grattage, suivie ou non du décès.

On arrête la distribution des moules de l'Île-du-Prince-Édouard le 29 novembre. Plusieurs autres cas ayant été signalés à Montréal le 1er décembre, on prend ce jour-là la décision d'aviser toute la population canadienne de ne pas consommer de moules en provenance de l'Île-du-Prince-Édouard distribuées après le 1er novembre 1987; et les moules sont retirées des magasins d'alimentation et des restaurants. Tous les sous-ministres provinciaux de la santé sont avertis par télex.

Le 3 décembre, on met sur pied un groupe de travail analytique pour coordonner les divers efforts de recherche entrepris par le gouvernement et autres organismes: y participent, Pêches et Océans, Santé et Bien-être social Canada, Environnement Canada, le Conseil national de recherches, le ministère des Pêches de l'Î.-P.-É. et l'*Atlantic Veterinary College*. Ce groupe se tient au courant des événements lors de conférences téléphoniques organisées tous les quelques jours par Pêches et Océans, à Moncton, du 3 décembre 1988 au 12 janvier 1989; il examine également les moules (et autres mollusques), la vase des rivières et le plancton pour détecter la présence de pesticides, de métaux lourds et de bactéries pathogènes.

Le premier cas mortel survient le 9 décembre 1987, suivi de 4 autres décès entre le 12 et le 16 décembre 1987 et le 9 mars 1988; mais ce dernier décès n'est pas directement relié à l'ingestion de moules toxiques.

On décide de faire des essais sur des moules en provenance non seulement de l'est de l'Île-du- Prince-Édouard mais également de toutes les régions de l'estuaire du Saint-Laurent, des côtes de Terre-Neuve, du Nouveau-Brunswick et de Nouvelle-Écosse. Dans les quelques jours qui suivent, si la plupart des échantillons ne révèlent aucune toxicité, les moules des Îles de la Madeleine, au Québec, et les huîtres de deux baies du Nouveau-Brunswick tuent des souris, mais non pas de la même manière que les moules de l'Île-du-Prince-Édouard. Ce n'est pas non plus la réaction typique de l'intoxication paralysante par les mollusques, à savoir la mort par paralysie dans un délai de 15 minutes. Bien qu'aucune maladie n'ait été mise en rapport avec ces moules ou ces huîtres

toxiques, on prend la décision d'empêcher la vente de tous les pétoncles, huîtres, moules et quahogs vivants en provenance du Canada atlantique jusqu'à nouvel avis. Par la suite il s'avérera, en ce qui concerne les moules des Îles de la Madeleine, que le décès des souris a été causé par une légère intoxication paralysante. Bien que les analystes travaillant sur les souris s'en soient doutés, l'hypothèse devait être confirmée par la chromatographie en phase liquide à haut rendement (Pêches et Océans, Mont-Joli, Québec). À la suite de cette découverte, toutes les souris seront examinées non pas durant seulement 15 minutes mais durant 18 à 24 h. Le problème de la toxicité des huîtres sera plus long à résoudre, étant moins prioritaire (ces huîtres ne sont normalement pas récoltées en hiver); aucune recherche ne sera entreprise avant la reconnaissance de l'acide domoïque comme la toxine inconnue de l'Île-du-Prince-Édouard. On attribuera le décès de ces souris à des niveaux élevés de zinc dans les mollusques (800 ppm). L'origine de ce zinc n'a pas été déterminée: est-elle naturelle (filtration des sols) ou industrielle (pollution)? Si cette forte concentration de zinc tue les souris plusieurs heures après l'injection, elle est sans effet sur les êtres humains; les huîtres ont donc été par la suite autorisées à la vente.

À la mi-décembre, on se rend compte que plus de 200 cas sont en rapport possible avec les moules de l'Île-du-Prince-Édouard, les premiers étant apparus du 4 novembre au 1er décembre, date du premier avis public, bien qu'ils ne répondissent pas tous à la définition du syndrome. Aucune autre source n'a été reconnue. Le 18 décembre, le C.N.R. annonce que le poison isolé des moules toxiques est un aminoacide excitateur, l'acide domoïque (poids moléculaire 311). En janvier 1988, on met au point une méthode de chromatographie en phase liquide à haut rendement pour quantifier l'acide domoïque dans les extraits acides de mollusques; on l'utilise immédiatement, bien que l'essai biologique sur la souris demeure la méthode la plus sûre pour décider l'ouverture et la fermeture des secteurs. Les échantillons de moules provenant des diverses concessions des fleuves de l'est de l'Île-du-Prince-Édouard ont montré la présence d'acide domoïque depuis la fin du mois d'octobre (début de la récolte) jusqu'à la mi-janvier alors que les niveaux avaient diminué au point d'être à peine détectables (p. ex. de 1 et 4 ppm). 98 p. 100 des moules toxiques mangées par les victimes provenaient de l'une ou l'autre de deux concessions du fleuve Cardigan.

Au début, on a cru que l'acide domoïque dans le secteur du fleuve Cardigan provenait de l'algue rouge *Chondria baileyana*, une espèce présente dans les eaux de l'Île-du-Prince-Édouard, car l'unique source d'acide domoïque connue jusque-là était une algue japonaise, *Chondria armata*. Cependant, bien que l'on ait découvert qu'un spécimen d'herbier de *C. baileyana* contenait de l'acide domoïque, la quantité d'algues rouges dans les estuaires ne serait pas suffisante pour expliquer la toxicité trouvée dans les moules. Les autres agents possibles étaient les dinoflagellés (tel *Prorocentrum*), les pesticides et les métaux lourds, tous éliminés faute de niveaux significatifs. Le plancton constituait une autre source possible, vu que les échantillons prélevés à la mi-décembre s'étaient avérés toxiques pour la souris et qu'on a montré par la suite qu'ils contenaient de l'acide domoïque. La diatomée *Nitzschia pungens* est l'organisme dominant dans ce plancton; les essais en culture pure devaient confirmer que l'acide domoïque provient de cette *Nitzschia*.

Une fois la nature de la toxine connue et les mollusques de la côte est examinés, la récolte commerciale est autorisée dans la plupart des régions dès le mois de février. Les moules en provenance de l'est de l'Île-du-Prince-Édouard et les huîtres riches en zinc en provenance du Nouveau-Brunswick sont autorisées à la vente en avril.

On continue tout au long de l'année à examiner les mollusques, d'une part par l'essai sur la souris mis au point pour l'intoxication paralysante par les mollusques mais en allongeant les temps d'observation, d'autre part par la chromatographie en phase liquide à haut rendement à la recherche de l'acide domoïque. Durant l'automne et l'hiver 1988-1989, les mollusques seront de nouveau toxiques, mais à un degré moindre que l'année antérieure; les récoltes seront toutefois interdites pour les mollusques présentant des niveaux d'acide domoïque supérieurs à 20 microgrammes par 100 grammes. Lorsque la floraison de *Nitzschia* toxique dans l'est de l'Île-du-Prince-Édouard aura diminué en 1989, les moules seront de nouveau disponibles pour la consommation. Aucun cas de maladie ne sera alors relié à ces moules.

3. *Présentation clinique de l'intoxication aiguë par l'acide domoïque: Observations de cas*

J. Teitelbaum

En novembre 1987, au Canada, 145 personnes ont présenté des symptômes digestifs et neurologiques après ingestion de moules en provenance de l'Île-du-Prince-Édouard. Cette intoxication de masse est par la suite mise en rapport avec la présence dans les moules d'une neurotoxine, l'acide domoïque.

On présente ici 3 cas illustrant certains aspects de ce nouveau syndrome.

Cas n° 1

Cet homme âgé de 84 ans est porteur d'un adénome hypophysaire stable, diagnostiqué en 1985, qui ne pose aucun problème. Il a subi en 1982 la résection d'un épithélioma du rectum sans récidive. Il a des antécédents d'ostéoarthrite. Le seul médicament qu'il prend est l'Indocid. Il ne boit pas d'alcool en quantité excessive et ne fume pas. Il pourvoit à tous ses besoins et s'occupe encore de son agence immobilière. Vers 18 h le 19 novembre 1987, il mange chez lui un grand nombre de moules de l'Île-du-Prince-Édouard. Selon sa famille, au bout d'une heure il commence à avoir des nausées et à vomir. Les vomissements durent toute la nuit. On le conduit à l'hôpital le lendemain matin car il est somnolent, perturbé et désorienté. À son arrivée, on le trouve déshydraté. Pression artérielle 110/80, pouls 100, température rectale 38,5°. L'examen somatique ne montre qu'une pneumonie du lobe inférieur droit. Du point de vue neurologique le malade est désorienté dans les 3 modalités; il présente un état confusionnel et délire par moments. Les paires crâniennes sont normales. L'examen moteur montre une masse musculaire normale; augmentation du tonus et légère faiblesse au membre supérieur gauche avec accentuation des réflexes. Réflexes plantaire en flexion.

Dans les jours qui suivent son état s'aggrave. La confusion persiste. La fièvre est élevée en dépit d'un traitement antibiotique. L'incapacité atteint son maximum 10 jours après l'ingestion: coma mais respiration spontanée, conservation des réflexes du tronc cérébral. L'excès de secrétions bronchiques a commandé l'intubation. Quelque 7 jours après l'ingestion, sont apparues des secousses focales du membre supérieur droit, des crises toniques généralisées et des absences. On a aussi observé un myoclonus facial et des mouvements involontaires de mastication. Les phénomènes convulsifs résistent à la phénytoïne; on les jugule avec difficulté par de fortes doses de diazepam et de phénobarbital en endoveineuse.

Du point de vue biologique, à cette phase aiguë, il existe une polynucléose, une hyperazotémie avec légère hypercréatininémie à mettre sur le compte de la déshydratation, une augmentation de la créatine-kinase (MM) sur celui des convulsions. Deux ponctions lombaires sont normales. Les EEG répétés montrent un ralentissement généralisé de l'activité cérébrale avec des signes épileptiformes surtout au lobe temporal gauche. La tomographie informatisée décèle une atrophie cérébrale diffuse normale à cet âge. Au bout de 4 semaines, l'électromyographie montre une dénervation généralisée et une vitesse de conduction normale. Puis, pendant 4 à 6 semaines, le malade s'améliore lentement. Au bout de 3 mois, il est éveillé; la parole, le jugement et les rapports sociaux sont normaux. Mais il est désorienté dans l'espace et le temps, et ne se rappelle rien de sa maladie aiguë. En dépit d'une mémoire rétrograde normale, il ne retient rien de ce qu'il apprend. Les paires crâniennes sont intactes. Atrophie marquée des muscles des extrémités. Les réflexes ostéotendineux sont obtenu à grand-peine, les achilléens ne le sont pas du tout. L'examen sensoriel est normal, à part une très légère perte du sens de la vibration aux membres inférieurs.

Cas n° 2

Le malade est un professeur âgé de 71 ans. Il est en traitement pour un parkinsonisme léger et des ulcères gastroduodénaux: Artane et cimetidine. Il n'abuse pas de l'alcool. Le soir du 22 novembre 1987 il mange des moules de l'Île-du-Prince-Édouard. Il n'éprouve d'abord qu'un peu de nausée sans vomissement, diarrhée ou douleur abdominale. Au bout de 24 h, en raison d'un peu de somnolence, de faiblesse générale et d'un comportement bizarre, on le conduit chez le médecin. Cet homme intelligent s'est mis à oublier ce qu'on lui a dit et ne semble pas capable d'accomplir son travail. On ne pose à ce moment-là aucun diagnostic précis. Pendant 3 jours il accuse une fatigue inhabituelle et une faiblesse dans les mains. Il a de la difficulté à se concentrer, à reconnaître les visages, à se rappeler la date de réunions qu'on vient de convoquer et ce qu'il devait y dire. Au bout de 4 mois, sa mémoire est en grande partie revenue; il a retrouvé, subjectivement, toute sa force; à l'examen, les fonctions motrices corticales et les paires crâniennes sont normales. La force musculaire est bonne; tout au plus note-t-on une légère atrophie des muscles des extrémités. Les réflexes sont absents. Perte du sens de la vibration aux membres inférieurs.

Au bout de 4 mois également, l'étude biochimique complète est normale, de même que la tomodensitométrie informatisée du cerveau avec et sans contraste. L'EEG montre un léger ralentissement diffus de l'activité de fond. L'examen neuropsychologique donne un QI de 130, une parole normale et, seule anomalie, une diminution du rappel spatio-visuel différé. L'EMG démontre une dénervation chronique mais active, témoin soit d'une légère neuropathie axonale sensorimotrice diffuse, soit de lésions des neurones moteurs et des ganglions des racines postérieures.

Cas n° 3

Il s'agit d'un homme de 69 ans. Il présente un diabète ayant débuté à l'âge adulte et bien réglé. Ses médicaments comprennent Euglucon, méthyldopa et aspirine. Sa prise d'alcool est moyenne. Il fume 25 cigarettes par jour. Le 20

novembre 1987 il consomme des moules de l'Île-du-Prince-Édouard. Au bout de 3 h il accuse de fortes nausées et il vomit. Au bout de 24 h il est inconscient, mais les réflexes du tronc cérébral sont conservés. Encore quelques heures plus tard il manifeste une hémorragie digestive et un état de choc, non seulement par hypovolémie mais aussi à cause d'une vasodilatation massive qui s'amende spontanément au bout de 10 h. Dix jours après l'ingestion, on observe un syndrome moteur inédit: alors que le malade ne répond pas encore aux questions, on lui trouve une parésie droite avec exagération du tonus et des réflexes qui dure 2 ou 3 jours, disparaît, revient à gauche cette fois et dure encore 2 ou 3 jours, puis le tout disparaît complètement. En même temps on a noté une ophtalmoplégie externe complète avec absence des réflexes caloriques et oculo-céphaliques. Malgré tout, le malade cligne des yeux, déglutit et respire normalement. Sur 10 jours la conjugaison des mouvements oculaires se perd, puis revient lentement à la normale. Il n'y a pas eu de convulsions. Au cours des douze semaines suivantes il s'est amélioré, retrouvant lentement la conscience et la parole. Mais il présente encore de graves problèmes de mémoire et de concentration. Il s'agit d'une amnésie rétrograde partielle et d'une amnésie antérograde frappante. De même, on a constaté une diminution de la masse musculaire des mains et des pieds, mais la force et les réflexes semblaient normaux. Un examen sensoriel démontrait une diminution de la sensation du toucher et de la douleur aux extrémités et des vibrations aux membres inférieurs. Conservation du sens de la position était normal.

À l'arrivée du malade à l'hôpital, son taux de globules blancs polynucléaires était élevé, de même que l'azotémie et la créatininémie. Légère augmentation de la CPK. La tomodensitométrie informatisée du cerveau est normale, ainsi que le liquide céphalorachidien.

On a effectué plusieurs électro-encéphalogrammes. Cinq jours après l'ingestion des moules, on observait un ralentissement généralisé plus marqué à gauche. Deux semaines plus tard, on note des signes d'encéphalopathie métabolique, de nature non épileptique. Au bout de quatre mois le tracé s'est amélioré et ne montrait qu'une légère perturbation généralisée de l'activité de fond. En ce qui concerne l'électromyographie, pratiquée 4 semaines après l'ingestion, elle montre des vitesses de conduction tout à fait normales, mais une importante dénervation active des groupes musculaires proximaux et distaux. Quatre mois plus tard, amendement partiel de la dénervation et légère neuropathie axonale sensorimotrice résiduelle.

Discussion

La lecture de ces 3 observations montre à quel point les manifestations de l'intoxication par l'acide domoïque sont variables. Toutes trois font mention de nausée et de vomissements, suivis de confusion, de désorientation et d'altérations de la conscience de gravité variable, et parfois de convulsions. Dans 2 cas en phase aiguë on note des troubles moteurs (hémiparésie, ophtalmoplégie) de nature transitoire. Parmi les manifestations tardives, les troubles de la mémoire et la neuropathie axonale sont remarquables; on les a d'ores et déjà étudiées chez de nombreux malades. Espérons que les renseignements donnés ici faciliteront le diagnostic de cette intoxication.

4. *Intoxication amnésiante par les coquillages : nouveau syndrome clinique attribuable à l'acide domoïque*

T.M. Perl, L. Bédard, T. Kosatsky, J.C. Hockin, E.C.D. Todd, L.A. McNutt, et R.S. Remis

Introduction

À la fin de novembre 1987, on a signalé que des personnes gravement malades avaient éprouvé, de manière aiguë, de la confusion, une perte de mémoire importante et de la désorientation. Dans les 4 cas de référence, les malades avaient ingéré des moules cultivées dans l'est de l'Île-du-Prince-Édouard dans les 24 heures précédant l'apparition des symptômes. Même si ces manifestations ne correspondaient pas à celles de l'intoxication paralysante par les coquillages (I.P.C.), pour éliminer cette possiblité on a récupéré des moules des repas incriminés afin de pratiquer l'analyse habituelle à la recherche de la toxine de l'I.P.C. selon la méthode du dosage biologique sur souris. Une recherche active a permis de découvrir rapidement d'autres cas partout au Canada. Les autorités canadiennes ont ordonné le retrait des moules suspectes et, le 1er décembre 1987, le public a officiellement été averti de ne pas consommer les moules en provenance de l'est du Canada.

Méthodes

Recherche et suivi des cas

Est considéré comme un cas de maladie liée aux moules celui de toute personne qui a consommé des moules de l'Île-du-Prince-Édouard à partir du 1er novembre 1987 et qui a éprouvé dans les 24 h au moins un des symptômes gastro-intestinaux suivants: vomissement, diarrhée, crampes abdominales, ou dans les 48 h au moins un des symptômes neurologiques suivants: confusion, perte de mémoire, désorientation, signe objectif majeur (convulsion, coma paralysie des nerfs crâniens). Les cas ont été reconnus par les services locaux, provinciaux et nationaux de santé. Après réception des rapports préliminaires, on a interrogé la plupart des malades par téléphone. On collige des données cliniques complémentaires par l'examen des dossiers d'hospitalisation, des résumés préparés au moment du congé et des rapports d'autopsie.

Études de laboratoire

Lorsque la chose a été possible, les moules liées aux cas de maladie ont été récupérées dans des restaurants, dans des foyers et chez des détaillants. Des échantillons de sérum ou de plasma prélevés chez 17 malades au Québec ont été analysés pour déceler la présence d'acide domoïque.

Détermination de la provenance des moules

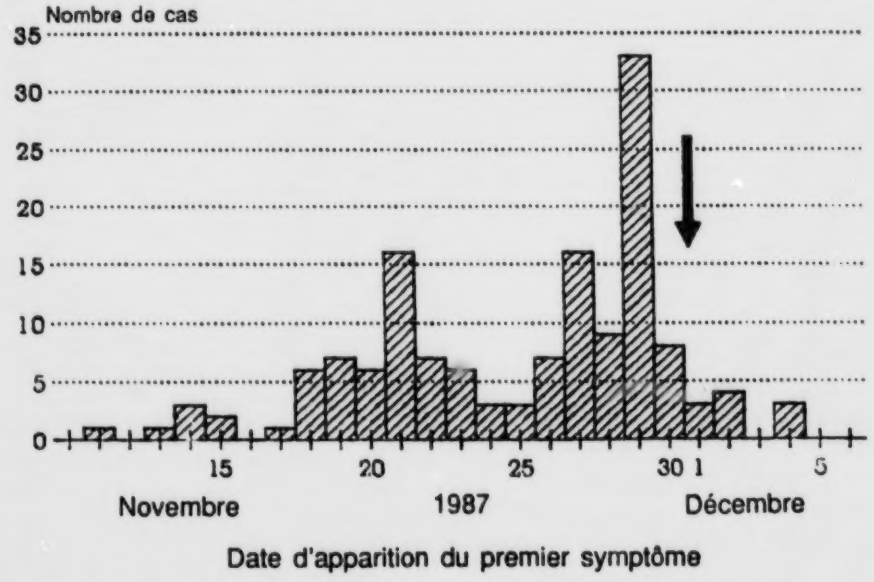
Afin de déterminer la provenance des moules consommées par les personnes malades, on a examiné et comparé les factures du mois de novembre envoyées par les distributeurs aux restaurateurs et aux détaillants, et par les producteurs aux distributeurs. On a considéré que les moules provenaient de l'Î.-P.-É. lorsque les factures indiquaient que le distributeur avait reçu les moules de cette province dans les 14 jours précédant la vente au restaurateur ou au détaillant.

Résultats

Description des cas

Nous avons recueilli 229 rapports préliminaires de maladie reliée à la consommation de moules au Canada dont le début se situe entre le 4 novembre et le 4 décembre 1987. Ils concernent 107 cas reconnus à partir des données des questionnaires et 38 cas probables relevés grâce à d'autres

Figure 1
Distribution des cas canadiens d'intoxication liée aux moules, selon la date d'apparition des symptômes (Novembre à décembre 1987)



Flèche : date du retrait des moules du marché et de la diffusion de l'avertissement au public

sources d'information comme les dossiers d'hospitalisation et de suivi. Aucun cas n'a été confirmé à l'extérieur du Canada (figure 1).

Les données présentées ici sont fondées sur 145 cas confirmés ou probables. Il y a autant d'hommes que de femmes. Au total, 80 % des malades avaient plus de 40 ans et près de 60 %, entre 40 et 60 ans. La répartition géographique et les taux de survenue par province sont présentés dans le tableau 1.

L'intervalle entre l'ingestion des moules et l'apparition du premier symptôme varie de 15 minutes à 38 h (médiane de 6 h) et, entre la consommation des moules et l'apparition des symptômes neurologiques, de 2 à 58 h (médiane de 16 h). La maladie s'est manifestée par des symptômes gastro-intestinaux et des symptômes neurologiques (tableau 2) qui allaient de légers à suffisamment graves pour nécessiter une hospitalisation. Au moins un des symptômes neurologiques objectifs est présent chez 37 (26 %) des 145 cas.

Dix-huit pour cent des malades (26/145) sont hospitalisés, dont 50 % (13/26) en soins intensifs (SI). La présence de signes neurologiques et celle de maladie grave nécessitant des soins en SI sont en rapport avec l'âge.

Quatre décès surviennent dans les 24 jours suivant l'hospitalisation. Un des malades gravement atteints est décédé d'un infarctus du myocarde 3 mois après sa sortie de l'hôpital.

Le traitement en SI et le décès sont directement reliés à l'âge; 11 des 13 patients admis aux SI et tous ceux qui devaient décéder avaient plus de 68 ans. Les 2 autres malades, qui étaient plus jeunes, étaient atteints d'une néphropathie chronique nécessitant le recours à la dialyse.

Analyses de laboratoire

Les concentrations d'acide domoïque dans les échantillons de moules liées à la maladie sont connues pour 10 des cas; elles varient de 31 à 128 mg/100g. L'analyse quantitative de l'acide domoïque dans les moules récupérées indique que la gravité de la maladie est fonction de la concentration d'acide domoïque dans les échantillons.

Détermination de la provenance des moules

Pendant la période qui nous intéresse, 48 restaurants et 20 foyers sont en cause. Parmi les malades, 72 % ont consommé des moules dans un restaurant. Les moules consommées dans ces restaurants et ces foyers provenaient de 19 distributeurs différents.

En novembre 1987, environ 75 000 kg de moules ont été vendus par les 2 coopératives de producteurs de l'Î.-P.-É. Près de la moitié de ces moules ont été expédiées au Québec et le reste, ailleurs au Canada et aux États-Unis. Des 145 malades, 140 (97%) ont consommé des moules dont l'origine pouvait être retracée à des zones d'exploitation du fleuve Cardigan, toutes situées à moins de 500 mètres les unes des autres. Les 5 autres cas de maladie gastro-intestinale légère ont été reliés à deux autres estuaires: Boughton (3 cas), Brudenell (2 cas).

Aucun nouveau cas n'a été signalé suivant le retrait de toutes les moules incriminées des restaurants et des distributeurs.

Tableau 1
Taux de survenue de la maladie par région dans le cas des moules provenant des estuaires de l'Î.-P.-É. en cause (novembre 1987)

Région	N^bre de cas	Kg de moules expédiés	Cas par 1 000 portions de 750 g
États-Unis	0	7,568	0.0
Alberta, Manitoba, Saskatchewan	0	5,705	0.0
Nouvelle-Écosse, Terre-Neuve	0	150	0.0
Nouveau-Brunswick	1	1,750	0.4
Ontario	15	18,273	0.6
Colombie-Britannique	7	3,818	1.3
Québec	109	41,341	1.9
Île-du-Prince-Édouard	13	4,145	2.3
Total	**145**	**75,182**	**1.4**

Tableau 2
Symptômes de la maladie liée aux moules dans 145 cas canadiens (novembre et décembre 1987)

	Fréquence[1]	% des cas
Symptômes gastro-intestinaux	**135/145**	**93**
Nausée[1]	116/145	80
Vomissement	94/145	64
Crampes abdominales	59/145	41
Diarrhée	59/145	41
Anorexie[1,2]	47/113	42
Symptômes neurologiques[2]	**37/145**	**26**
Céphalée	64/145	34
Perte d'équilibre/étourdissements[1]	48/145	33
Perte de mémoire	37/145	26

[1] Non retenu pour la définition de cas.

[2] Comprend seulement perte de mémoire, confusion, désorientation et autres signes objectifs; ne comprend pas la perte d'équilibre et les étourdissements.
Tous les symptômes n'étant pas connus pour tous les malades, nous faisons une estimation modeste; dans les cas où la réponse est inconnue, nous supposons que le symptôme était absent.

5. *Séquelles neurologiques de l'intoxication à l'acide domoïque*

J. Teitelbaum, R.J. Zatorre, S. Carpenter, D. Gendron et N.R. Cashman

Introduction

Du 11 novembre au 4 décembre 1987, on observe une épidémie de malaises reliée à l'ingestion de moules. Les épidémiologistes régionaux ont retracé l'origine des moules en cause; elles provenaient de deux zones d'exploitation dans l'estuaire d'un fleuve de l'Île-du-Prince-Édouard[1]. Chez les personnes atteintes, le tableau clinique ne ressemble en rien à celui de cas antérieurs de maladie provoquée par l'ingestion de bivalves, et semble représenter un nouveau syndrome clinique.

D'après T. Perl et coll. (voir la présentation 4), on croit que 145 malades ont été affectés. Soixante-dix pour cent de ceux-ci résidaient dans la province de Québec. Un tiers des malades présentaient des symptômes neurologiques et 4 sont morts. Au nombre des manifestations neurologiques aiguës, mentionnons les céphalées, les vertiges, la confusion, une altération de la vigilance pouvant aller de l'agitation au coma, et des convulsions chez certains. Les manifestations extra-neurologiques comprenaient nausées et vomissements, avec ou sans diarrhée, ainsi que des douleurs abdominales. Les chercheurs du Conseil national de la recherche ont reconnu, dans des extraits de moules, l'acide domoïque, un analogue du glutamate, qui, d'après eux, est la toxine responsable du syndrome[2].

Le glutamate est un neurotransmetteur excitotoxique qui a une affinité variable pour trois types de récepteurs : le récepteur du quisqualate (Quis), celui du N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et celui du kaïnate (KA). L'acide domoïque (AD) se fixe sur le récepteur du kaïnate 3 fois plus facilement que le KA et il est 20 fois plus puissant. En présence de glutamate, l'AD peut provoquer la dépolarisation massive des cellules, l'augmentation subséquente des ions calcium (Ca++) à l'intérieur des cellules, entraîner un dysfonctionnement de celles-ci ou leur mort. Après avoir suivi 3 patients hospitalisés dans notre établissement pour des symptômes consécutifs à l'ingestion de moules, le Dr Neil Casham et moi-même avons remarqué que, bien que ces patients se soient bien rétablis, il leur est resté des anomalies remarquables de l'état psychique. Pour évaluer les séquelles neurologiques chez ces patients et d'autres malades qui ont ingéré des moules toxiques, nous avons étudié l'évolution clinique de 14 patients pendant 12 mois après l'ingestion.

Matériels et méthodes

Protocole clinique

Les sujets désignés par T. Perl et ses collaborateurs de Santé et Bien-être social Canada ont été rejoints par téléphone et nous leur avons demandé de participer à notre étude. Quatorze d'entre eux ont accepté au départ. Ceux-ci et des membres de leur famille ont été interrogés en utilisant un questionnaire normalisé mettant l'accent sur les symptômes neurologiques d'appel et leur progression au cours des mois suivants. Nous avons examiné les antécédents médicaux et le niveau de fonctionnement antérieur de ces personnes. Nous avons examiné les dossiers de tous les patients qui ont été hospitalisés pendant la phase aiguë de leur maladie. Des examens neurologiques complets ont été effectués chez 3 patients pendant la phase aiguë de la maladie, et au bout de 4, 8 et 12 mois dans tous les cas.

Les résultats de laboratoire obtenus pendant la phase aiguë de la maladie, ont été examinés. De 4 à 6 mois post-ingestion, ont fait la numération sanguine complète, des analyses biochimiques, un électroencéphalogramme et des études électromyographiques chez tous les patients. On fait la tomographie crânienne assistée par ordinateur aux patients qui n'avaient pas subi cet examen au départ, ou dont le tomogramme antérieur s'était révélé anormal. Cinq patients ont subi des examens du cerveau par résonance magnétique dans le cadre du protocole de tomographie à positons de l'Institut de recherche psychiatrique (MRI-PET)[3]. Les études électromyographiques et électroencéphalographiques sont reprises de 8 à 10 mois après l'accident.

Ce syndrome est caractérisé par des anomalies de l'état psychique. Tous les patients ont subi des tests neurologiques normalisés : QI, fonction linguistique, mémoire, intégrité du lobe frontal. On a déterminé le QI verbal et le QI non verbal à l'aide de l'échelle d'intelligence des adultes de Wechsler[4]. La compréhension et la fluidité verbales ont été évaluées à l'aide du test de De Renzi[5] et du test de fluidité verbale de Thurstone et Thurstone[6]. On s'est servi du test de Wingfield pour évaluer la capacité de nommer des objets[7]. Pour juger de l'intégrité du lobe frontal, on s'est servi du test Wisconsin de classement des cartes[8]. La mémoire visuo-spatiale a été examinée à l'aide du test des figures complexes de Rey[9] qui comporte une copie immédiate et un rappel différé de 45 minutes. Pour évaluer la rétention du matériel verbal, l'échelle clinique de mémoire de Wechsler a été modifiée en lui ajoutant un rappel différé de 90 minutes.

Préparations histologiques

Les cerveaux de 4 patients décédés 7, 12, 25, et 98 jours après l'ingestion de moules toxiques ont été fixés dans le formaldéhyde. Leurs manifestations cliniques ne sont pas comprises parmi celles des 14 patients que nous avons suivis régulièrement. On prélève des coupes représentatives dans toutes les régions corticales, y compris l'insula. Les hippocampes et les noyaux amygdaliens sont examinés, de même que des portions représentatives du prosencéphale, du thalamus, de l'hypothalamus, des noyaux gris centraux, du tronc cérébral et du cervelet. Les coupes dans la paraffine sont colorées à l'hématoxyline-éosine, au Holzen, à l'acide periodique-Schiff, au Bielschowsky ainsi que par la méthode Luxop Fast Blue.

Résultats

Manifestations médicales générales

Dans notre groupe de 14 patients, tous sauf un ont présenté des nausées et des

vomissements de 1,5 à 24 h post-ingestion. Douze sur 13 ont aussi souffert de douleurs abdominales mais 3 seulement ont eu de la diarrhée. Il y a un sérieux embarras bronchique chez 7 patients; il a fallu en intuber 6 qui étaient inconscients. Après qu'ils ont atteint un sommet dans leurs déficits, l'état des patients se stabilise et s'améliore lentement. Il leur faut une période de 24 h à 12 semaines avant d'être capables de réagir normalement à leur environnement. Cet intervalle est particulièrement long chez ceux qui ont présenté les symptômes les plus graves. Six patients ont fait de la fièvre, on a décelé un foyer d'infection chez 4 d'entre eux. Les 8 patients hospitalisés après l'ingestion ont présenté un certain degré d'instabilité hémodynamique et de la brady-arythmie ou de la tachy-arythmie, mais seulement 3 sont entrés en état de choc avec une tension artérielle inférieure à 90/60 (1, 8, 12). Dans les 3 cas, celle-ci est revenue à la normale en moins de 6 h. La cause de la chute de pression semble avoir été une diminution transitoire de la résistance vasculaire.

Quatre mois plus tard, toutes ces manifestations sont disparues et les seuls problèmes non neurologiques qui restent sont ceux qui existaient avant l'ingestion des moules.

Profil neuropsychologique

Tous nos patients ont manifesté un état confusionnel de 4 à 72 h après l'ingestion. Le degré de conscience était affecté chez 12 d'entre eux: six présentaient de l'agitation ou de la somnolence, 6 autres sont devenus comateux. L'intervalle avant d'atteindre le déficit maximal est de 4 h chez les patients les moins affectés et de 72 h chez ceux qui ont perdu tout contact.

Les tests psychologiques en bonne et due forme seront entrepris de 4 à 6 mois après l'intoxication. La plupart des sujets ne montrent pas de signes de détérioration globale: le QI correspond au niveau intellectuel avant la survenue de la maladie. Tous les patients ont bien réussi les tests du langage et de la fonction du lobe frontal. À l'exception d'une patiente qui a un profil neuropsychologique normal (cas 4, 44 ans), et d'un patient qui a un déficit global (cas 7, 87 ans), tous les autres cas montrent une déficience disproportionnée de la mémoire par rapport aux autres fonctions intellectuelles, de gravité variable, qui se manifestait principalement au niveau du rappel différé des informations verbales et visuo-spatiales. Les tests sont évalués plus en détail par le Dr Zatorre[10].

Crises épileptiformes et myoclonies

D'après T. Perl et coll., 6,8 % de toutes les personnes affectées ont eu des convulsions. Dans notre groupe de 14 patients, 5 ont eu des crises épileptiques pendant la phase aiguë de l'intoxication. Les crises de divers types comprenaient des crises motrices focales, des crises de grand mal et des crises partielles complexes. Quatre des 5 patients avaient des mouvements masticatoires et des myoclonies faciales. Le cinquième présentait une posture anormale du bras gauche. Ces crises étaient relativement résistantes au Dilantin et ont nécessité l'administration de fortes doses intraveineuses de Valium et de phénobarbital. Quatre mois après l'ingestion, les crises avaient disparu.

Des électroencéphalogrammes ont été faits chez 7 patients seulement pendant la phase aiguë. Tous présentaient des troubles généralisés, de moyens à graves, de l'activité cérébrale. Un seul patient avait un tracé épileptiforme. Quatre mois plus tard, 3 patients ont des résultats normaux et l'état de tous les patients s'est amélioré.

Troubles moteurs

Pendant la phase aiguë postingestion, tous les patients se sont plaints de faiblesse généralisée et de flageolement. Mais 4 seulement présentaient des signes objectifs.

Pendant cette phase aiguë, deux patients ont manifesté un syndrome presque identique d'hémiparésie et d'ophtalmoplégie alternantes. L'hémiparésie avec hypertonie et hyperréfléxie ipsilatérales disparaissait en 24 à 36 h, pour reparaître du côté opposé avant de disparaître à nouveau plus tard. Les anomalies au niveau des mouvements oculaires étaient d'abord caractérisées par une ophtalmoplégie complète avec absence des réflexes oculocéphaliques et oculovestibulaires malgré des réflexes de clignement et des réflexes cornéens normaux. Ces anomalies ont disparu peu à peu: 10 jours après leur apparition, les mouvements extraoculaires étaient normaux.

L'ophtalmoparésie seule était présente de façon aiguë chez 2 autres patients chez qui des défauts d'abduction laissaient croire à une parésie bilatérale de la sixième paire. La diplopie a duré 24 h chez l'un des patients, mais a pris 12 semaines pour disparaître chez l'autre.

La tomodensitométrie crânienne s'est révélée normale chez 5 patients étudiés pendant la phase aiguë, et chez 5 autres patients 4 mois postingestion.

Quatre mois après l'ingestion de moules, 9 patients se plaignent encore de faiblesse légère accompagnée de crampes musculaires chez 2 d'entre eux, et de fasciculations chez 3 autres.

Dans 2 cas, les études électromyographiques sériées obtenues à 2, 6 et 16 semaines post-ingestion ont révélé une dénervation aiguë; les amplitudes motrices étaient diminuées de 10 à 20 %, la vitesse de conduction nerveuse était presque normale (diminution de 0 % à 10 %). De 4 à 6 mois après l'ingestion de moules toxiques, 11 patients sont examinés. Les résultats sont normaux chez 2 d'entre eux. Des 9 autres, dont 3 sont diabétiques, 6 montrent une diminution de 10 % à 30 % de l'amplitude des potentiels moteurs ainsi que de 0 % à 10 % de la vitesse de conduction des nerfs moteurs. Celle des nerfs sensoriels est encore moins affectée.

Les résultats laissent croire à l'existence soit d'une atteinte des cellules de la corne antérieure de la moelle épinière et des ganglions des racines dorsales, soit d'une axonopathie diffuse.

Études histologiques

Les résultats de ces études ont été détaillés par le Dr S. Carpenter[11]. En bref, les zones les plus gravement affectées dans les 4 cas soumis à une autopsie sont l'hippocampe et le noyau amygdalien. Les lésions du thalamus sont particulièrement importantes dans les cas 2 et 3 (surtout au noyau postéro-interne), mais minimes dans les cas 1 et 4. Il y a des lésions du cortex de l'insula et de la face inférieure du lobe frontal (particulièrement de la sixième couche corticale) dans les 3 premiers cas mais non dans le quatrième. Tous les cas présentent des lésions au niveau de l'avant-mur, des zones olfactives

secondaires, de la région septale et de son nucleus accumbens. Dans l'hippocampe on constate une nécrose ou une perte cellulaire, selon l'intervalle de temps écoulé, au niveau de tous les neurones pyramidaux excepté dans l'aire H2 qui est relativement épargnée. Dans le cas numéro 2, la réaction astrocytaire est plus avancée en H3, 4, et 5 qu'en H1. Dans les cas 3 et 4, H1 montre un certain degré de cavitation. Les cellules dentées sont en cause dans tous les cas excepté le numéro 2.

Discussion

On peut se demander si les symptômes et les lésions que nous avons décrits sont réellement reliés à l'intoxication par l'acide domoïque. Les preuves sont indirectes mais importantes. On n'a pas retrouvé d'acide domoïque dans le sérum, et aucun échantillon d'urine ou de selles n'a été prélevé en phase aiguë pour sa recherche. Néanmoins, la relation entre la maladie aiguë et l'ingestion de moules au cours des 24 h précédentes est constante. Dans tous les cas, on a retracé l'origine des moules à 2 zones d'exploitation dans un estuaire de l'Île-du-Prince-Édouard; on a constaté que les moules provenant de ces deux endroits contenaient de l'acide domoïque mais aucune autre toxine. En outre, la topographie uniforme des lésions cérébrales chez les 4 patients décédés correspond bien à ce qui a été signalé chez les animaux d'expérience après une intoxication à l'acide kaïnique, un analogue de l'acide domoïque.

La majorité des malades de cet échantillon ont montré des preuves manifestes de perte de mémoire sélective, avec conservation de l'aptitude intellectuelle générale et une fonction linguistique intacte. La perte de mémoire manifestée chez eux ressemble de près à l'amnésie décrite par Scoville et Milner en 1958[12] chez un patient qui avait subi une excision bilatérale du noyau amygdalien et de l'hippocampe. La présence à l'autopsie de lésions bilatérales de l'hippocampe chez nos 4 patients morts d'intoxication par les moules appuient cette hypothèse. Ces lésions ne peuvent être attribuées à une anoxie, puisque seulement 3 patients sur 14 ont eu une tension artérielle inférieure à 90/60 mn Hg et qu'il n'y avait aucun signe d'ischémie à la tomodensitométrie crânienne.

L'acide domoïque, un acide aminé excitatoire d'abord découvert dans l'algue *Chondria armata*[13], et maintenant isolé de *Nitzschia pungens*[14], dans les eaux de l'Île-du-Prince-Édouard, serait l'agent responsable de ce syndrome. Cette algue a été utilisée pendant des siècles au Japon comme ascaricide et insecticide[15]. Le domoate est relié par sa structure à un autre acide aminé excitatoire, le kaïnate, mais il a trois fois plus d'affinité pour les récepteurs du kaïnate dans le système nerveux central[16-19]. Il existe des ressemblances frappantes entre les anomalies provoquées par l'acide domoïque et l'acide kaïnique chez les animaux de laboratoire et les effets de l'ingestion de moules chez nos patients.

L'injection d'acide kaïnique dans le striatum ou dans la circulation générale chez le rat produit des tremblements comme d'un chien mouillé, des mouvements masticatoires, des redressements sur les pattes postérieures, un clonus des membres antérieurs, et des convulsions limbiques (confirmées par électrodes profondes) qui sont relativement résistants à la phénytoine et plus facilement traités par les barbituriques et la benzodiazépine[20-22].

Chez le rat ainsi traité il s'est produit une dégénérescence neuronale dans le cortex olfactif, le complexe amygdalien, l'hippocampe et les parties voisines du thalamus et du cortex. Le cervelet, le tronc cérébral et la moelle épinière sembleraient ne pas être affectés[20-24]. Les lésions de l'hippocampe atteignent précocement un maximum dans les cellules pyramidales des aires CA3 et CA4.

On sait que le domoate et le kaïnate affectent les neurones de la moelle épinière dans plusieurs espèces animales. Les signes de dénervation à l'électromyogramme pris chez nos patients peuvent être expliqués par une action cytotoxique directe sur les cellules des cornes antérieures et des ganglions des racines postérieures. Ou bien le domoate causerait une axonopathie diffuse, mais on n'en imagine pas le mécanisme.

L'épidémie dont nous avons signalé les séquelles semble avoir été un événement unique, qui ne devrait pas se reproduire. On surveille maintenant de façon très étroite les concentrations d'acide domoïque dans les estuaires de l'Île-du-Prince-Édouard où les moules sont cultivées. Il demeure possible que des cas surviennent après l'ingestion de bivalves provenant d'autres parties de la planète; les données que nous avons signalées permettront de reconnaître plus facilement l'intoxication.

Références

1. Perl T, Bédard L, Remis R, et coll. *Intoxication following mussel ingestion in Montreal*. Can Dis Wkly Rep 1987; 13: 224-225.
2. Wright JLC, Boyd RK, de Freitas ASW, et coll. *Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island*. Can J Chem 1989; 67: 481-490.
3. Gjedde A, Evans AC. *PET studies of domoic acid poisoning in humans: excitotoxic destruction of brain glutamatergic pathways, revealed in measurements of glucose metabolism by positron emission tomography*. Ce Symposium, Présentation 20.
4. Wechsler D. Psychological Corporation. Wechsler Adult Intelligence Scale. Revisé. New York: Harcourt Brace Jovanovich, 1981.
5. De Renzi E, Vignolo L. *The Token Test: A sensitive test to detect receptive disturbance in aphasics*. Brain 1962; 85: 665-675.
6. Thurstone L, Thurstone T. *The Chicago tests of primary mental abilities*. Chicago: Science Research Associates, 1943.
7. Oldfield RC,Wingfield A. *Response latencies in naming objects*. Q J Exp Psychol 1965; 17: 273-281.
8. Milner B. *Effects of different brain lesions on card sorting*. Arch Neurol 1963; 9: 90-100.
9. Rey A. *Examen psychologique dans les cas d'encephalopathie traumatique*. Arch Psychol 1942; 28: 112.
10. Zattore R. *Memory loss following domoic acid intoxication from ingestion of toxic mussels*. Ce Symposium, Présentation 19.

11. Carpenter S. *Human neuropathology of encephalopathic toxic mussel poisoning*. Ce Symposium, Présentation 15.

12. Milner B. *Psychological effects produced by temporal lobe excision*. Res Publ Assoc Nerv Ment Dis 1958; 36: 244-257.

13. Takemoto T. *Isolation and structural identification of naturally occurring excitatory amino acids*. Dans: McGeer EG, Olney JW, McGeer P, éds. *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*. New York: Raven Press, 1978: 1-5.

14. Subba Rao DV, Quillam MA, Pockington R. *Domoic acid, a neurotoxic amino acid produced by the marine diatom Nitzschia pungens* in culture. Can J Fish Aquat Sci 1988; 45: 2076-2079.

15. Sakai M. *Insecticidal properties of domoic acid*. Takeda Kenyusho Nempo 1960; 19: 37-41.

16. Zaczek R, Coyle JT. *Excitatory amino acid analogs: Neurotoxicity and seizures*. Neuropharmacology 1982; 21: 15-26.

17. Schwarcz R, Scholz D, Coyle JT. *Structure activity relations for the neurotoxicity of kainic acid derivatives and glutamate analogs*. Neuropharmacology 1978; 17: 145-151.

18. Debonnel G, Beauchesne L, de Montigny C. *Domoic acid, the alleged mussel toxin, might produce its neurotoxic effect through kainate receptor activation – an electrophysiological study in the rat dorsal hippocampus*. Can J Physiol Pharmacol 1989; 67: 29-33.

19. Olney JW, Rhee VA, Ho OL. *Kainic acid, a powerful neurotoxic analog of glutamate*. Brain Res 1974; 77: 507-512.

20. Schwob JE, Fuller T, Price JL, Olney JW. *Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intra-cerebral injection of kainic acid: a histological study*. Neuroscience 1980; 5: 991-1014.

21. Sloviter RS, Damiano B. *On the relationship of kainic acid-induced epileptiform activity and hippocampal neuronal damage*. Neuropharmacology 1981; 20: 1003-1011.

22. Tremblay E, Nitecka L, Berger ML, Bendri Y. *Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. Clinical, electromyographic and metabolic observations*. Neuroscience 1984; 13(4): 1051-1072.

23. Shinozaki H, Konishi S. *Actions of several antihelminthics and insecticides on rat cortical neurons*. Brain Res 1970; 24: 368-371.

24. Coyle J. *Neurotoxic action of kainic acid*. J Neurochem 1983; 41(1): 1-11.

Discussion : Présentations n^{os} 3, 4, 5.

D. Johnson : La première chose qui m'a frappé, ce sont les observations que vous avez tous faites au sujet de l'âge des patients. J'ai également remarqué que chez plusieurs de ces derniers, on a observé la présence d'une insuffisance rénale à un degré plus ou moins prononcé. Il pourrait en résulter une diminution de l'excrétion de l'acide domoïque. Avez-vous vraiment examiné tous les dossiers pour vérifier la fonction rénale chez tous les patients?

J. Teitelbaum : J'ai eu l'occasion d'examiner les dossiers de 16 malades; il s'agissait principalement de ceux qui ont été hospitalisés dans les services de soins intensifs de la région de Montréal, dans l'Île-du-Prince-Édouard et en Ontario. Chez presque tous ces malades, on pouvait trouver des raisons pouvant expliquer une diminution de la fonction rénale, comme vous l'avez laissé entendre. Nombre d'entre eux prenaient des médicaments, parmi lesquels des inhibiteurs des prostaglandines, et certains prenaient des bêta-bloquants. Ils présentaient également des maladies concomitantes qui, en plus des médicaments, pourraient elles-mêmes très certainement contribuer à réduire la filtration. De plus, il y avait deux cas d'insuffisance rénale chronique nécessitant dialyse, à savoir deux personnes âgées de moins de 50 ans qui ont été hospitalisées à cause de graves manifestations touchant à la fois le système neurologique et le système cardio-vasculaire. Il y a également un rapport non confirmé provenant des Maritimes concernant une autre personne atteinte d'insuffisance rénale chronique qui a éprouvé de graves troubles de la mémoire et qui a été hospitalisée; la personne a été admise dans un établissement psychiatrique.

M. Ball : D^{r} Teitelbaum, lorsque, dans le suivi à long terme, vous avez réparti les 12 personnes en deux catégories, à savoir catégorie légère-moyenne et catégorie grave, est-ce que les personnes qui avaient été le plus malades au début sont les mêmes personnes qui se sont retrouvées plus tard dans la deuxième catégorie?

J. Teitelbaum : Je n'en ai pas parlé, mais cette corrélation existe très certainement. Les sujets qui étaient devenus comateux et qui ont été le plus malades, et qui ont mis le plus de temps à se remettre, ont été les plus gravement touchés plus tard.

T. Perl : Je veux poser une question à Jeannie Teitelbaum. Une des impressions que j'ai eues lorsque j'ai examiné les dossiers, c'est que les convulsions ont constitué un point tournant critique chez ces personnes. Avez-vous trouvé des indications montrant que si vous avez des convulsions, les risques d'avoir des déficits neurologiques résiduels sont plus élevés?

J. Teitelbaum : Malheureusement, au moins deux de nos patients n'ont présenté aucune activité de cette nature, que ce soit à l'EEG ou cliniquement, mais ils font tous deux partie du groupe des sujets les plus gravement touchés, notamment le patient n° 6; c'est pourquoi je ne puis dire si une telle corrélation existe.

J. Donaldson : En ce qui concerne les constatations expérimentales faites chez les rats, il me semble que les données que vous avez présentées rappellent fortement l'encéphalopathie spongieuse. J'aimerais demander si vous avez envisagé cette possibilité. Deuxièmement, les effets que vous avez décrits sont très évocateurs de l'action des glycosides cardiaques comme cause de lésions de l'hippocampe et des convulsions ou de l'encéphalopathie.

J. Teitelbaum : Je crois que le D^{r} Carpenter est sans doute mieux placé pour répondre à la question, à savoir si

les manifestations ressemblent à l'encéphalopathie spongieuse ou non.

S. Carpenter : Je dirais qu'il n'y a pas de ressemblance avec l'encéphalopathie spongieuse. Chez nos malades il y a nécrose neuronale, mais il n'y a pas de vacuolisation particulière des neurones.

J. Donaldson : Et les lésions des neurones moteurs de la moelle épinière?

J. Teitelbaum : Pour l'instant, nous n'avons pas de données histo-pathologiques concernant quelque lésion que ce soit touchant la moelle épinière, parce que nous n'avons reçu aucun spécimen de moelle épinière; il n'y a donc pas eu d'analyse.

S. Carpenter : En fait, j'ai reçu un petit segment de moelle épinière dorsale. Or cette partie de la moelle est relativement pauvre en neurones moteurs et je n'ai constaté aucune anomalie. Ce spécimen provenait du malade qui est décédé trois mois après l'ingestion des moules.

Question provenant de la salle : Est-ce que quelqu'un a fait un examen histologique des muscles pour déceler des lésions, je veux dire chez l'humain?

J. Teitelbaum : Non, j'en ai bien peur.

Question provenant de la salle : Ainsi, l'atrophie n'a pas été attestée?

J. Teitelbaum : Non, pas du point de vue histologique.

I. Hynie : J'aimerais demander à Trish Perl si le matériel biologique, provenant des malades, qui a été envoyé au tout début pour analyse toxicologique, a été conservé, de manière que l'on puisse l'examiner de nouveau, maintenant que l'on sait que nous devrions rechercher l'acide domoïque?

T. Perl : Je crois que vous et Todd avez des prélèvements de sérum provenant de 17 malades. Malheureusement, beaucoup de ces échantillons ont été prélevés alors que la maladie évoluait depuis une à deux semaines. Nous avons un peu de liquide céphalo-rachidien provenant d'un autre malade et, de plus, nous avons un peu de tissu cérébral qui nous a été expédié dans la glace sèche. Malheureusement, le spécimen n'était pas assez gros pour nous permettre de procéder à une analyse du cerveau à l'aide de coupes histologiques.

I. Hynie : Rétrospectivement, il semblerait que ce dont nous avons vraiment besoin, ce soient des échantillons d'urine et de selles parce que, premièrement, il semble que la plus grande partie de l'acide domoïque n'est pas absorbée, c'est pourquoi il y aurait un tel écart entre la toxicité par voie buccale et la toxicité par voie parentérale, et, deuxièmement, parce qu'il s'agit d'un composé assez polaire, ce qui implique que la plus grande partie de ce produit est soit détoxiquée et éliminée sous forme de glucuronate ou de sulfate, soit excrétée telle quelle, mais la concentration dans le sérum sera probablement très faible. Je me demande si quelqu'un a déjà eu des échantillons d'urine?

T. Perl : Il est possible que l'on ait eu un échantillon d'urine, mais nous avons été incapables de le retracer. C'est malheureux, mais ce n'est pas le genre de spécimen que les laboratoires hospitaliers gardent! La prochaine fois nous les obtiendrons.

C. Pinsky : Il existe probablement une explication rationelle des neuropathies périphériques qui ont été observées. On sait que les neurones afférents primaires et dorsaux possèdent tous deux des récepteurs du kaïnate et du quisqualate et qu'il en est de même pour quelques-une des cellules de la corne antérieure. L'acide domoïque pourrait surstimuler ces neurones; il y a même des récepteurs sur les fibres elles-mêmes. Je m'attendrais à ce qu'en conséquence, l'on puisse trouver une axonopathie dans les neurones de la corne antérieure et une dégénérescence des fibres dans les afférents sensoriels, mais naturellement il est très probable que ces neurones afférents périphériques retrouveraient leur état normal. Avez-vous eu des observations selon lesquelles la guérison de ces neuropathies aurait été meilleure que celle des atteintes centrales?

J. Teitelbaum : Nous n'avons rien qui indique qu'il y aurait rétablissement de l'atteinte centrale en ce qui a trait à la mémoire, bien que chez les sujets qui ont présenté des anomalies globales, ces dernières soient disparues. Les problèmes de mémoire, eux, sont restés. Les lésions périphériques ont semblé guérir chez les personnes chez qui nous avons effectué des études en série, et une fois nous avons observé la guérison de ce qui était vraisemblablement une axonopathie.

G. Galvin : Avez-vous déterminé les concentrations d'acide domoïque dans le plasma ou le LCR et, si tel est le cas, y a-t-il une relation entre ces concentrations et la gravité des lésions touchant le SNC ou le tractus gastro-intestinal?

T. Perl : Je laisserais plutôt au D^r Todd le soin de répondre à cette question. À ce que je sache, les 17 échantillons de Montréal étaient négatifs pour ce qui est du sérum et du LCR, mais je pense que le D^r Todd peut commenter mieux que moi la technique d'analyse.

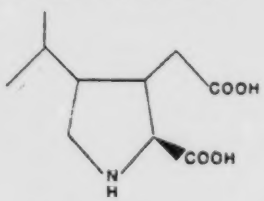
E. Todd : Oui, ils étaient négatifs.

6. *Toxicologie de l'acide domoïque administré par voie générale à des rongeurs et des primates*

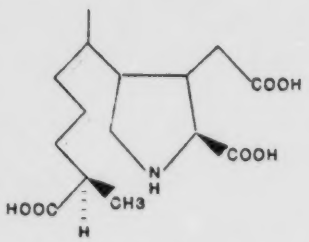
F. Iverson, J. Truelove, L. Tryphonas et E.A. Nera

À la fin de l'année 1987, environ 156 personnes, principalement de la province de Québec, ont accusé des symptomes digestifs (nausées, vomissements) et montraient, dans certains cas, des symptômes neurologiques (perte de l'équilibre, perte de mémoire, désorientation) après avoir consommé des moules de culture récoltées dans des estuaires de l'Île-du-Prince-Édouard. Les études menées par la Direction générale de la protection de la santé ont montré que les moules contenaient une substance qui entraîne un syndrome de grattage et la mort chez les souris auxquelles on administre des extraits de moules toxiques préparés de la façon habituelle dans la recherche de l'intoxication paralysante par les mollusques. L'acide domoïque (Figure 1) a été identifié par la suite comme contaminant des moules[1,2].

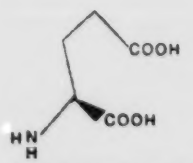
Figure 1
Structure de l'acide kaïnique, domoïque et glutamique



ACIDE KAÏNIQUE



ACIDE DOMOÏQUE



ACIDE GLUTAMIQUE

L'acide domoïque est un aminoacide neurotoxique excitateur connu englobant la structure de l'acide glutamique, lui-même excitateur, et ayant également une ressemblance de structure avec l'acide kaïnique, un autre aminoacide neurotoxique se manifestant naturellement. Le mécanisme par lequel ces substances exercent leur neurotoxicité a été analysé par Olney et coll.[3]. On a utilisé ces composés comme agents causant des lésions cérébrales afin de créer des modèles pour l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer et autres troubles. Malheureusement, l'acide domoïque est une denrée rare, ce qui limite dans bien des cas les investigations toxicologiques classiques. Par exemple, les lésions cérébrales attribuées à l'acide domoïque et son important effet inhibiteur des enzymes choline-acétyltransférase et glutamate-décarboxylase du cerveau ont été démontrés par injection directe plutôt que par voie générale[4]. Néanmoins, on trouve dans la littérature scientifique des données qui permettent d'établir des hypothèses sur la toxicité de l'acide domoïque administré par voie générale.

L'acide domoïque est un agoniste d'un sous-type de récepteur, connu sous le nom de récepteur de l'acide kaïnique[5]. Celui-ci, qui se trouve plus facilement et a davantage été étudié, exerce plusieurs effets cliniques sur les rongeurs: excitation, grattage, frissons et convulsions[6,7]. Ces effets ressemblent aux signes atypiques observés après l'injection intra-péritonéale (i.p.) d'extraits de moules toxiques à des souris selon le protocole utilisé dans la recherche de l'intoxication paralysante par les mollusques. Toutefois, comme ces signes cliniques sont très différents de ceux qui surviennent normalement dans celle-ci, ils ont d'abord été qualifiés d'«atypiques», c'est-à-dire non représentatifs de l'intoxication paralysante par les mollusques.

L'activité pharmacologique de l'acide domoïque par rapport à celle d'autres agonistes du récepteur des aminoacides excitateurs varie selon le point critique choisi. On a rapporté qu'il est deux fois plus efficace que l'acide kaïnique pour dépolariser les neurones de grenouilles[8]. D'autres études indiquent que le potentiel neuroexcitateur de l'acide domoïque est trois fois plus grand que celui de l'acide kaïnique, mais que son activité neurotoxique et convulsivante est égale à celle de ce dernier[4]. L'acide domoïque est donc un composé relativement toxique, ayant une puissance égale, ou peut-être supérieure, à celle de l'acide kaïnique. Cela suggère une toxicité létale aiguë d'environ 5 mg/kg (par voie parentérale), la capacité d'entraîner des lésions de l'hippocampe (perte de neurones dans la région CA3) et de la rétine[9].

Il existe aussi quelques données antérieures sur l'utilisation de l'acide domoïque chez l'homme. Au Japon, certains insulaires utilisaient, comme remède domestique, des extraits de l'algue *Chondria armata* qui en contient[10]. Il était également reconnu pour son activité sur les insectes: les mouches meurent sitôt après s'être posées sur les algues échouées sur le rivage. Lorsqu'on a étudié cet effet, on a démontré pour l'acide domoïque une action insecticide au moins égale à celle du γ-BHC et du DDT[11]. C'est cette propriété de l'acide domoïque sur les insectes qui a dû pousser à l'utiliser comme anthelminthique chez l'homme; aucun effet toxique n'a été signalé dans les essais où des extraits d'algues ont été administrés comme anthelminthiques à des enfants. On a aussi administré *per os* à des enfants l'acide domoïque extrait d'algues à la dose de 0,5 mg/kg, sans qu'aucun effet nocif n'ait là encore été signalé[10]. C'est pourquoi certains ont pu croire que l'acide domoïque ne pouvait pas être l'agent responsable de l'intoxication par des moules, bien qu'on connût ses effets pharmacologiques et toxicologiques. On a même administré l'acide kaïnique à environ

28 000 écoliers sans qu'aucun effet toxique n'ait été signalé. Nous avons donc entrepris des études de toxicologie[12] pour comparer la dosimétrie des extraits de moules à celle de l'acide domoïque et pour déterminer l'utilité de la souris dans les essais biologiques de l'acide domoïque. Le Conseil national de recherches (CNR) nous a fourni environ 150 mg d'acide domoïque purifié; les extraits de moules sont préparés selon le protocole utilisé dans la recherche de l'intoxication paralysante par les mollusques. La faible quantité d'acide domoïque purifié alors disponible limitait l'expérimentation qui pouvait alors être réalisée; des études ultérieures menées à la Direction générale de la protection de la santé, sur lesquelles nous ne nous étendrons pas, indiquent que l'acide domoïque n'est pas un mutagène[13]. Les travaux préliminaires ne révèlent aucune activité tératogène.

Nous avons d'abord administré en i.p. à des souris femelles des fractions aliquotes d'extraits de moules toxiques. Le comportement de grattage est provoqué seulement par la fraction contenant l'acide domoïque. On sait qu'il existe des isomères de l'acide domoïque; on suppose qu'ils surviendraient à l'élution ou près de l'élution de l'acide domoïque[14,15]. Plusieurs de ces isomères et analogues de l'acide domoïque incorporent des modifications de structure qui paraissent diminuer la toxicité. Cela n'exclut pas la possibilité que d'autres isomères ayant une plus grande activité puissent exister. Nous n'avons fait aucune tentative pour isoler ces isomères ou mesurer leur toxicité, puisque l'acide domoïque seul est capable de produire la toxicité observée chez la souris et chez d'autres animaux de laboratoire.

Le tableau 1 montre la réponse aux doses chez les souris à l'extrait de moules toxiques et à l'acide domoïque purifié. Les signes cliniques chez les souris (grattage, roulades, tremblements, convulsions) ont été observés en utilisant soit l'acide domoïque purifié administré en soluté salé, soit l'acide domoïque purifié ajouté à l'extrait préparé à partir des moules qui ne contenaient pas d'acide domoïque (extrait négatif). La réponse aux doses observée dans ces essais est la même pour chaque diluant, ce qui rejoint l'hypothèse que l'acide domoïque est le principal élément toxique présent dans les moules. Si le syndrome de grattage est choisi comme étant le premier signe vraiment représentatif de la réaction aux moules toxiques, le niveau auquel on n'observe aucun effet est de 12 µg (24 ppm dans les moules). La mort survient à des niveaux d'acide domoïque atteignant ou dépassant 100 µg (5 mg/kg). Nos résultats indiquent que la toxicité aiguë de l'acide domoïque est qualitativement et quantitativement équivalente à celle des extraits de moules toxiques.

Une autre série d'études (Tableau 2) porte sur la toxicité de l'acide domoïque administré par voie buccale à des souris. Les résultats indiquent une réponse variable, les signes cliniques (grattage, crises) se manifestant à des doses comprises entre 35 et 100 mg/kg de poids corporel. Là encore, l'extrait de moules toxiques et l'acide domoïque purifié en soluté salé ont produit une réponse dosimétrique sensiblement équivalente. Cependant, il est évident que la toxicité produite par l'acide domoïque après administration buccale nécessite des quantités d'acide 10 fois plus élevées que celles utilisées par voie parentérale. Ces résultats concordent avec des trouvailles japonaises non publiées qui n'indiquent «aucun effet» chez les souris auxquelles on a donné une dose buccale de 100 mg/kg.

Nous avons également déterminé la réponse aux doses d'acide domoïque chez le rat (Tableau 3). Dans cette espèce, les effets cliniques sont encore équivalents, que l'on utilise l'extrait de moules ou l'acide domoïque purifié, ce qui fait croire que l'acide domoïque est le facteur toxique dans les moules. L'administration par voie intrapéritonéale produit des convulsions et la mort à la dose de 4 mg/kg, tandis que l'administration buccale de l'extrait de moule entraîne une intoxication seulement lorsque les doses atteignent 70 mg/kg, ce qui reflète la situation observée chez la souris. Comme il était prévisible, les lésions cérébrales observées après administration i.p. (4 mg/kg), consistaient en une

Tableau 1.
Réponse selon la dose à l'administration d'acide domoïque en I.P. chez des souris femelles

Acide domoïque (µg)	Délai* avant le grattage	Souris ayant répondu	Délai* avant la mort	Souris ayant répondu
Extrait de moule toxique				
12	—	0/3	—	0/3
23	45	1/3	—	0/3
47	38	3/3	—	0/3
117	20	4/4	43	2/4
233	16	6/6	25	6/6
Acide domoïque dans l'extrait négatif				
20	—	0/3	—	0/3
50	29	2/3	—	0/3
100	12	3/3	—	0/3
200	11	3/3	34	3/3
Acide domoïque en soluté salé				
20	32	3/3	—	0/3
50	32	3/3	—	0/3
100	21	3/3	95	1/3
200	17	3/3	65	3/3

* Temps en minutes

dégénérescence et une perte neuronales dans la région CA3 de l'hippocampe.

Puisque l'administration buccale est beaucoup moins toxique que l'injection, il semblait raisonnable de penser que le taux d'absorption de l'acide domoïque par le tube digestif est un facteur significatif dans la production de la toxicité. Nous avons fait quelques essais d'excrétion urinaire et fécale de l'acide domoïque chez des rats et des souris (Tableau 4). Les résultats sont assez variables, mais pour les deux espèces les moyennes sont comparables: presque 100 p. 100 de la dose administrée est récupérée dans les fèces dans un délai de 36 h. Administré par la bouche, l'acide domoïque a une faible toxicité chez les rongeurs, car il n'est pas absorbé de façon appréciable.

Notre étude de la toxicité de l'acide domoïque chez le singe Cynomolgus (Tableau 5) n'est pas encore terminée. Les résultats préliminaires peuvent contribuer à la connaissance de la toxicité de l'acide domoïque. Une dose unique de 4 mg/kg d'acide domoïque i.p. est létale, ce qui rejoint les données de toxicité obtenues chez les rongeurs. Les lésions cérébrales observées se situent dans les mêmes zones que chez les rongeurs. (Une description complète des lésions chez les rongeurs et les primates sera présentée ultérieurement dans ce symposium). Une dose buccale de 10 mg/kg d'acide domoïque est tolérée, mais contrairement aux rongeurs (qui ne peuvent pas vomir), les primates auront des haut-le-cœur ou vomiront, ou les deux, peu de temps après l'administration. Une telle réaction survient aux doses de 10 et 5 mg/kg, mais non à la dose de 0,5 mg/kg. Les vomissements (et les haut-le-cœur à faibles doses) résultent probablement d'un effet direct de l'acide domoïque sur le système nerveux central et non d'une irritation gastro-intestinale par cet acide ou par d'autres composants des moules. Il apparaît qu'aux doses buccales n'ayant pas d'effet sur les rongeurs, le primate peut absorber suffisamment d'acide domoïque pour avoir des vomissements. Pour savoir si cela reflète une différence d'absorption entre ces deux espèces, il faudra attendre des études de marquage isotopique de l'acide domoïque ou l'application de méthodes analytiques permettant de détecter l'acide domoïque dans le sang. Les résultats des études de dosage par voie intraveineuse soulignent l'importance de l'absorption dans la production de la toxicité de l'acide domoïque, puisqu'en fait une dose de 12,5 µg/kg d'acide domoïque suffit à provoquer des haut-le-cœur. Ces résultats suggèrent aussi qu'une fois l'acide domoïque absorbé, l'élimination ou le métabolisme, plutôt qu'une hypothétique barrière hémato-encéphalique, seraient les principaux facteurs modifiant la réponse toxique. Ces suppositions seront vérifiées au fur et à mesure que les études sur les primates progressent.

L'information provenant de la littérature scientifique et des expériences décrites ci-dessus peut servir à apprécier le rôle de l'acide domoïque dans les cas d'intoxication chez l'homme après la consommation de moules.

- La toxicité des extraits de moules réside dans la fraction chromatographique qui contient l'acide domoïque.
- L'acide domoïque seul, à la même concentration que celle trouvée dans les moules toxiques, peut entraîner chez l'homme les mêmes signes d'intoxication qu'on observe chez les animaux auxquels l'extrait de moule toxique est administré.
- L'acide domoïque et l'extrait de moule toxique contenant l'acide domoïque provoquent des lésions cérébrales identiques chez les rongeurs et les primates.
- Les symptômes constatés chez les personnes ayant consommé des moules sont compatibles avec les propriétés pharmacologiques et toxicologiques de l'acide domoïque.
- La quantité d'acide domoïque consommée par les individus atteindrait d'après les calculs 5 ou 6 mg/kg, en se basant sur des niveaux d'acide domoïque dans les moules de 960 à 1280 ppm. Ces quantités provoquent des vomissements chez les singes Cynomolgus à qui on a administré de l'acide domoïque, et sont dix fois plus élevées que les doses administrées comme anthelminthiques au Japon.
- L'acide domoïque n'est pas bien absorbé par le tube digestif. Il semble raisonnable de supposer que toute lésion ou trouble métabolique qui augmenterait l'absorption accroîtrait grandement la toxicité. Par conséquent, les personnes souffrant de lésions gastro-intestinales ou

Tableau 2.
Réponse selon la dose d'acide domoïque (Administration buccale à des souris)

Acide domoïque (mg/kg)	Réponse	Délai* avant la mort
Extrait de moule toxique		
35	grattage	-
35	nulle	-
47	grattage	26
58	nulle	-
80	nulle	-
100	nulle	-
104	convulsion	28
Acide domoïque en soluté salé		
20	nulle	-
28	nulle	-
35	grattage	-
65	grattage	-
68	convulsion	49
70	nulle	-
80	nulle	-

* Temps en minutes

d'abaissement de l'épuration rénale de l'acide domoïque pourraient être plus sujettes à la toxicité de l'acide domoïque. De même, l'absorption de l'acide glutamique chez l'homme est caractérisée par d'importantes variations individuelles.

En résumé, les propriétés pharmacologiques et toxicologiques de l'acide domoïque indiquent qu'il est bien l'agent responsable des symptômes digestifs et neurologiques manifestés par les personnes ayant consommé des moules toxiques en 1987. Le fait que les effets ont semblé différents d'une personne à l'autre peut s'expliquer (a) par la quantité ingérée, (b) par la quantité d'acide domoïque dans les moules et (c) par une sensibilité variable imputable aux facteurs susceptibles d'augmenter l'absorption de l'acide domoïque d'en empêcher l'élimination. Les symptômes neurologiques ont été le plus souvent observés chez les personnes âgées; et les cas les plus graves surviennent également dans cette tranche d'âge. Une combinaison des facteurs énumérés ci-dessus peut avoir prédisposé ces personnes aux effets toxiques de l'acide domoïque.

Tableau 3.
Réponse des rats à l'administration buccale ou I.P. de l'extrait de moule et de l'acide domoïque

Acide domoïque (mg/kg)	Réponse	Délai* avant la mort
Extrait de moules toxiques (i.p.)		
2	nulle	-
4	convulsion	71
4	convulsion	72
4	convulsion	-
7	convulsion	29
8	convulsion	21
Acide domoïque en soluté salé (i.p.)		
2	nulle	-
2	grattage	-
4	convulsion	112
8	convulsion	23
Extrait de moules toxiques (voie buccale)		
60	nulle	-
70	mastication	-
80	nulle	-
80	convulsion	32
82	convulsion	30
82	convulsion	44

* Temps en minutes

Tableau 4.
Excrétion fécale de l'acide domoïque (en 48 heures)

Espèce	Nombre	Quantité (%)
Rat	4	98 ± 12
Souris	4	102 ± 17

Références

1. Wright JLC, Boyd RK, de Freitas ASW, et coll. *Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island*. Can J Chem 1989; 67: 481-490
2. Perl TM, Bédard L, Kosatsky T, Hockin JC, Todd ECD, McNutt LA, Remis RS. *Amnesic shellfish poisoning: a new clinical syndrome due to domoic acid*. Ce symposium, présentation 4.
3. Olney JW, Rhee V, Ho OL. *Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate*. Brain Res 1974; 77: 507-512.
4. Zaczek R, Coyle JT. *Excitatory amino acid analogues: neurotoxicity and seizures*. Neuropharmacology 1982; 21: 15-26.
5. Meldrum B. *Excitatory amino acid antagonists as potential therapeutic agents*. Dans: Jenner P, éd. *Neurotoxins and their pharmacological implications*. New York: Raven Press, 1987: 33-53.
6. Worms P, Willigens M-T, Lloyd KG. *The behaviourial effects of systemically administered kainic acid: a pharmacological analysis*. Life Sci 1981; 29: 2215-2225.
7. Wood PL, Richard JW, Pilapil C, Nair NPV. *Antagonists of excitatory amino acids and cyclic guanosine monophosphate in cerebellum*. Neuropharmacology 1982; 21: 1235-1238.
8. Biscoe TJ, Evans RH, Headley PM, Martin M, Watkins JC. *Domoic and quisqualic acids as potent amino acid excitants of frog and rat spinal neurones*. Nature 1975; 255: 166-167.
9. Collins RC. *Neurotoxins and the selective vulnerability of brain*. Dans: Jenner P, éd. *Neurotoxins and their pharmacological implications*. New York: Raven Press, 1987: 1-17.
10. Daigo K. *Studies on the constituents of* **Chondria armata**. *II. Isolation of an anthelmintical constituent*. J Jpn Pharm Assoc 1959; 79: 353.

11. Maeda M, Kodama T, Tanata T, et coll. *Insecticidal and neuromuscular activities of domoic acid and its related compounds*. J Pesticide Sci 1984; 9: 27-32.

12. Iverson F, Truelove J, Nera E, Tryphonas L, Campbell JS, Lok E. *Domoic acid poisoning and mussel associated intoxication: preliminary investigations into the response of mice and rats to toxic mussel extract*. Food Chem Toxicol 1989; 27: 377-384.

13. Rogers CG, Boyes BG. *Evaluation of the genotoxicity of domoic acid in an hepatocyte-mediated assay with V79 Chinese hamster lung cells*. Mutat Res 1989; 226: 191-195.

14. Maeda M, Kodama T, Tanaka T, et coll. *Structures of isodomoic acids A, B, and C, novel insecticidal* amino acids *from the red alga Chondria armata*. Chem Pharm Bull 1986; 34: 4892-4895.

15. Maeda M, Kodama T, Tanaka T, et coll. *Structures of domoilactone A and B, novel amino acids from the red alga, Chondria armata*. Tetrahedron Lett 1987; 28: 633-636.

Discussion

A. Tasker, Charlottetown : D[r] Iverson, j'aimerais d'abord faire une courte observation sur la toxicité générale. Nous avons, nous aussi, étudié la relation dose-effet de l'acide domoïque sous diverses formes; nous avons mesuré notre toxicité d'une manière différente. Nous avons utilisé une échelle comportementale en sept points. Nos valeurs de DE_{50} sont presque identiques aux vôtres; il s'agit simplement d'une confirmation.

F. Iverson : Très bien, je vous en remercie.

A. Tasker, Charlottetown : L'autre question que j'ai en tête concerne les expériences *per os*. Est-ce que les animaux étaient à jeun au moment de l'administration du produit?

F. Iverson : Les expériences ont été réalisées avec des animaux à jeun et des animaux qui ne l'étaient pas.

A. Tasker, Charlottetown : Et, peu importe si les animaux étaient à jeun ou non, vous n'avez remarqué aucune différence en ce qui a trait à la biodisponibilité?

F. Iverson : Non, nous avons observé une grande variation dans la relation dose-effet et c'est le point que j'aimerais faire ressortir. Il a semblé que la plage d'absorption était assez grande chez ces animaux. Je pense que les études que nous avons réalisées sur l'excrétion indiquent qu'il y a une variation assez considérable. Vous comprendrez qu'il y a une nette différence entre une dose buccale d'acide domoïque dans le soluté physiologique et la préparation que l'on utilise pour le dosage biologique de la toxine responsable de l'intoxication paralysante par les coquillages (IPC). En réalité, ce n'est qu'un homogénat d'un lot de moules, que l'on chauffe et qu'on centrifuge pour le débarrasser des particules les plus grosses. Il y a des différences, mais je crois que l'expérience montre clairement, comme vous l'avez constaté, que l'acide domoïque semble causer la plus grande partie de la toxicité. Mais il y a une variabilité assez importante en ce qui concerne l'absorption. C'est pourquoi nous avons eu des effets à la concentration de 35 mg/kg dans un cas et de 117 dans un autre.

A. Tasker, Charlottetown : Oui, je confirme ces propos. Nous observons, essentiellement, le même phénomène avec l'administration *per os* chez les rats, du fait qu'il semble y avoir une grande variabilité au niveau de la biodisponibilité et que cette variabilité ne semble pas être en corrélation étroite avec aucun autre facteur, du moins d'après ce que nous pouvons voir.

F. Iverson : Bien, je suis heureux de l'entendre.

A. Novelli : J'ai une observation à faire au sujet de vos expériences comportant l'injection d'acide domoïque dans des extraits de moules toxiques. Il semble que l'acide domoïque en solution saline, pour une raison ou une autre, ait plus d'effet que l'acide domoïque dans

Tableau 5.
Réponse selon la dose à l'administration d'acide domoïque chez les singes cynomolgus

Acide domoïque (mg/kg)	Lésions	Voie	Réponse
0.5		buccale	nulle
5.0	-	buccale	Vomissement (début 12 h, durée 80 min) mastication, bâillement, tremblement de faible amplitude
10.0	-	buccale	Vomissement (début 1 h, durée 450 min) mastication, tremblement de faible amplitude
0.00625		i.v.	nulle
0.0125		i.v.	(début 8 min, durée 1 min)
0.025		i.v.	(début 4 min, durée 4 min)
0.05		i.v.	(début 12 min, durée 38 min)
0.20		i.v.	(début 8 min, durée 61 min)
0.50	-	i.v.	(début 17 min, durée 119 min)
4.0	+	i.p.	vomissement, mastication, rigidité, tremblement, incoordination, mort

l'extrait de moule. Toutefois, vous dites également que l'extrait de moule a été concentré de manière à obtenir des concentrations plus élevées d'acide domoïque. Cela m'amène maintenant à me poser des questions sur la concentration des ions bivalents dans l'extrait de moule, même dans un extrait normal de moules normales, parce qu'on a signalé que des concentrations très élevées d'ions bivalents inhibent l'action des acides aminés excitateurs sur les neurones de l'hippocampe et ailleurs. Ainsi, peut-être obtenez-vous une stimulation plus faible de votre effet à cause d'une interférence causée par des concentrations élevées d'ions. Je parle du magnésium, du cadmium, du zinc et de tout ce qui pourrait être présent.

F. Iverson : Il s'agit en effet d'une possibilité. Nous n'avons pas eu besoin de procéder à une concentration pour les essais par voie intrapéritonéale; nous venons tout juste de ne parler que des expériences *per os*. Nous avons toujours pris soin de répéter les mesures de l'acide domoïque pour nous assurer qu'il était toujours présent à la concentration de départ et nous avons mesuré sa concentration dans le produit que nous injections. Mais c'est vrai, il y a probablement des concentrations plus élevées d'ions dans le concentré et si elles avaient un effet, alors les moules toxiques seraient en fait moins toxiques que l'acide domoïque. De toute façon, l'emploi de celui-ci est plus sûr. Mais vous avez raison, il est possible qu'il y ait là une légère différence.

G. Debonnel, McGill : En ce qui concerne les singes qui ont été traités à l'acide domoïque par voie intraveineuse, j'ai eu l'impression que vous aviez obtenu une sorte de corrélation entre les doses et le moment d'apparition des symptômes : plus la dose est élevée, plus la période entre l'injection et l'apparition des symptômes est longue. Pouvez-vous élaborer davantage sur cette question ou s'agit-il tout simplement d'une impression?

F. Iverson : Je sais que nous avons obtenu une belle relation dose-effet. Nous pourrions retourner à la diapositive. J'ignore s'il y a une différence du point de vue du temps qui s'écoule avant l'apparition de la réponse, et s'il y a une corrélation. Je sais seulement qu'il y avait une très belle corrélation entre la dose et la durée de la réponse. Aux doses les plus faibles, la durée des haut-le-cœur est d'une couple de minutes ou parfois moins et, dans le cas des doses élevées, elle peut dépasser 119 minutes. Ainsi, il y a une très belle courbe dose-effet en ce qui concerne la durée des effets.

G. Debonnel, McGill : Si ma mémoire est fidèle, pour la dose la plus faible, le temps d'apparition de l'effet était d'environ 4 minutes et pour la dose la plus élevée, d'environ 7 minutes.

F. Iverson : Je dirais qu'il y a certainement une certaine variation du temps d'apparition de l'effet; je peux voir 8, 4, 12, 8 et 17 minutes. C'est très rapide et cela semble être une bonne moyenne. Toutefois, pour ce qui est de la durée, la courbe dose-effet augmente très bien : 1, 4, 38, 61 et 119. Je crois que c'est probablement cela qui compte. Les temps d'apparition sont très courts, mais cela n'a rien d'étonnant étant donné que la préparation a été administrée par voie intraveineuse.

7. *Chimie, biologie et toxicologie de l'acide domoïque et de ses isomères*

J.L.C. Wright, C.J. Bird, A.S.W. de Freitas, D. Hampson, J. McDonald et M.A. Quilliam

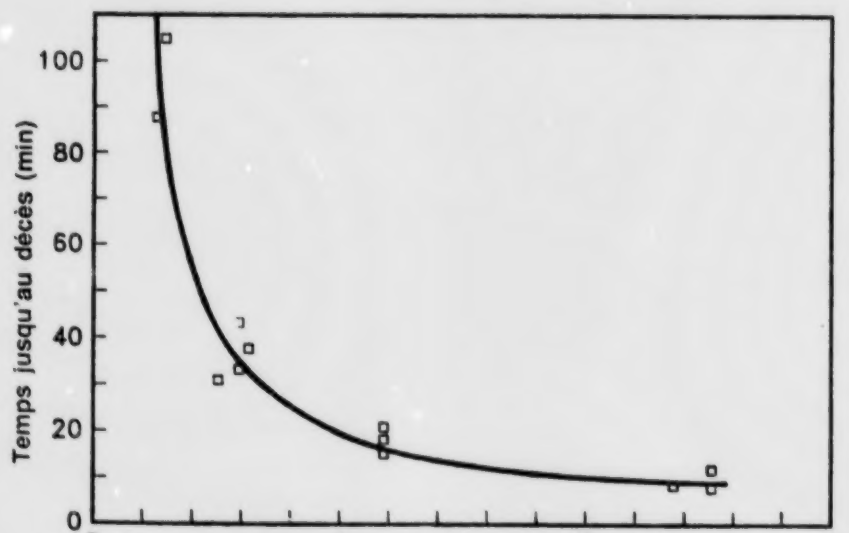
Résumé

L'agent causal de la toxicité des moules de culture provenant de régions déterminées de l'est de l'Île-du-Prince-Édouard (Î.-P.-É.) a été reconnu comme étant l'acide domoïque, un acide aminé neuroexcitateur. La toxine a été isolée à l'aide d'un certain nombre de techniques de séparation, y compris la chromatographie en phase liquide à haut rendement, l'électrophorèse sur papier à haut voltage, la chromatographie par échange d'ions, et elle a été caractérisée par un certain nombre de techniques spectroscopiques, comme l'ultraviolet, l'infrarouge, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique. On décrit en détail les méthodes d'isolement et de purification et signale certaines nouvelles données analytiques concernant l'acide domoïque. Une prolifération planctonique apparue au moment de l'épidémie, a donné des résultats positifs par dosages biologiques sur les souris. Elle était constituée presque entièrement de la diatomée pennée *Nitzschia pungens* (f. *multiseries*). On a trouvé une corrélation positive entre le nombre de *N. pungens* et la concentration d'acide domoïque dans le plancton. La diatomée en question, *Nitzschia pungens* f. *multiseries*, isolée dans la baie Cardigan, produit de l'acide domoïque *de novo* dans une culture en phase stationnaire à des concentrations (1 à 10 pg/cellules) comparables aux valeurs estimées pour *N. pungens* dans les échantillons de plancton. Nous avons conclu que *Nitzschia pungens* est la principale source d'acide domoïque dans les moules toxiques de l'est de l'Î.-P.-É. Une nouvelle prolifération monospécifique de *N. pungens* en novembre 1988 ainsi que la présence de l'acide domoïque dans le plancton et les moules viennent renforcer cette conclusion.

Introduction

À la fin de 1987, une poussée d'intoxication alimentaire mystérieuse et grave survient au Canada. L'intoxication se manifeste par les symptômes suivants : vomissement et diarrhée, suivis dans certains cas par de la confusion, une perte de mémoire, de la désorientation et même le coma. Deux malades âgés sont décédés; dans certains autres cas graves les symptômes neurologiques persistent toujours. Les épidémiologistes de Santé et Bien-être social Canada (SBSC) ont rapidement attribué la maladie à la consommation, dans des restaurants, de moules bleues (*Mytilus edulis L.*) de culture. En se servant du dosage biologique sur souris reconnu par l'AOAC pour la recherche de l'intoxication paralysante par les coquillages (IPC) liée à la marée rouge[1], les scientifiques de SBSC et du ministère des Pêches et des Océans (PEO) ont démontré que les moules contenaient effectivement un produit toxique et, qui plus est, ils ont été en mesure de déterminer que le problème était causé par les moules récoltées dans une région localisée de l'est de l'Î.-P.-É. L'injection intrapéritonéale d'extraits aqueux acides de moules suspectes à des souris[1] a causé la mort de ces dernières; la mort a cependant été précédée par des symptômes neurotoxiques hautement caractéristiques et inhabituels, très différents de ceux qui sont causés par l'IPC et d'autres toxines connues. On ignorait alors si l'agent toxique était un polluant d'origine anthropique ou une toxine naturelle. Une enquête poussée par une équipe de scientifiques du laboratoire de Halifax du Conseil national de recherches du Canada (CNRC) a établi que l'agent toxique est l'acide domoïque[2]. Dans les mois qui ont suivi, un travail de recherche de grande envergure auquel ont participé des scientifiques de PEO, du CNRC et de l'Université de

Figure 1
Courbe dose-effet typique reliant le moment du décès à l'équivalent en poids de tissu de moules entières utilisé pour obtenir l'extrait nécessaire à la réalisation du dosage biologique sur les souris



l'Île-du-Prince-Édouard a permis d'établir que la toxine a été produite par une diatomée pennée marine, *Nitzschia pungens* f. *multiseries*[3]. Des analyses chimiques plus poussées des extraits de moules et de phytoplancton ont révélé la présence d'une série d'isomères de l'acide domoïque dont l'activité biologique relative sera discutée.

Résultats et discussion

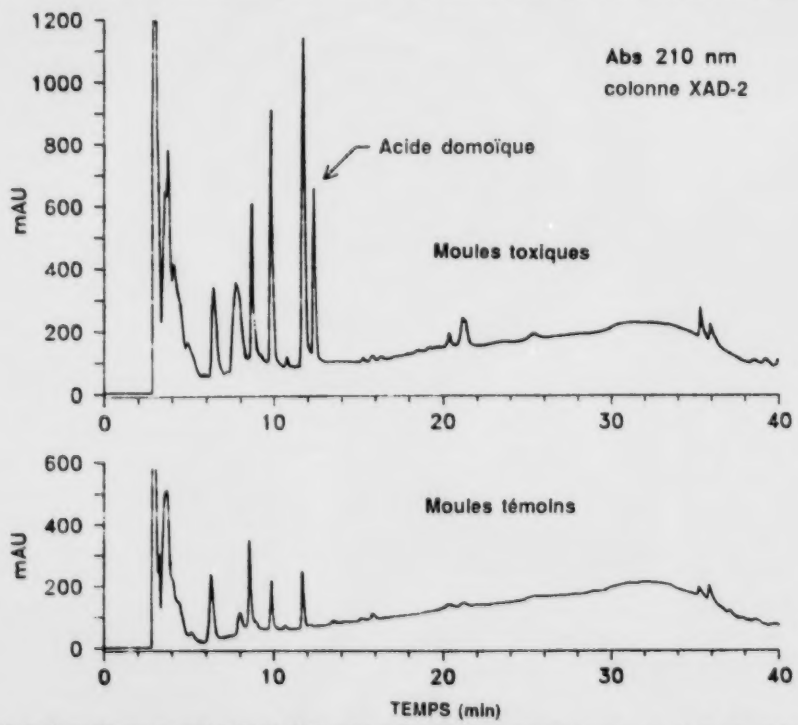
Les moules toxiques et les moules témoins (non toxiques) sont fournies par PEO (Charlottetown, Î.-P.-É.). Dans tous les cas, les extraits de moules toxiques et de moules témoins sont préparés suivant des méthodes identiques, afin que l'on puisse faire la distinction entre les effets du facteur toxique inconnu dans le dosage biologique d'une part et, d'autre part, la toxicité inhérente du sel dans certaines fractions et l'interférence possible d'autres facteurs comme les phases mobiles de la chromatographie. De plus, le fait de procéder en parallèle fait ressortir les signaux supplémentaires ou inhabituels présents dans les chromatogrammes et les spectres des seules fractions de moules toxiques. Le contrôle rigoureux de la dose utilisée dans le dosage biologique sur souris constitue un élément important de la méthode. Une courbe dose-effet préliminaire (voir fig. 1) indique une plage étroite, inférieure à un ordre de grandeur, pour le dosage biologique de la (ou des) toxine(s). Les extraits représentant 0,3-2,5 équivalents-grammes du tissu frais d'origine provoquent le décès des animaux d'expérience de 100 et 10 minutes respectivement après l'injection intrapéritonéale. Un réglage volumétrique est alors utilisé pour obtenir une dose intrapéritonéale se situant dans la gamme de 1,2 à 2,5 équivalents-grammes de tissu d'origine, quelle que soit la quantité réelle de matières non toxiques extraites. De plus, il est important de vérifier que les symptômes induits dans le dosage biologique par les fractions toxiques sont exactement les mêmes que ceux que l'on observe dans le cas des extraits de moules toxiques.

Dans les premières expériences, on sépare les glandes digestives des autres tissus de la moule. Il en résulte deux fractions dont chacune est extraite avec du méthanol et de l'eau (7:3 v/v), concentrée, puis extraite une nouvelle fois avec du dichlorométhane. Les extraits aqueux des deux fractions provenant des moules témoins ne révèlent aucune toxicité, mais les extraits de glande digestive des moules toxiques sont toxiques. Les autres tissus des moules toxiques présentent une faible toxicité, mais on attribue cette situation à une séparation imparfaite des deux fractions de tissus. Par la suite, pour gagner du temps durant les extractions à très grande échelle, la moule entière est traitée.

Dans les premiers travaux à la recherche de la toxine, plusieurs méthodes de séparation (chromatographie en phase liquide à haut rendement, CLHR; électrophorèse sur papier à haut voltage, EPHV; chromatographie par échange d'ions) ont été choisies pour éviter que dans une méthode particulière, la toxine soit masquée par un autre composé non toxique présent dans l'extrait. De plus, les fractions toxiques isolées par chacune des méthodes sont analysées à l'aide d'une autre pour vérifier qu'il s'agit bien de la même substance, ce qui constitue une validation réciproque interne des méthodes de séparation.

Les résultats de l'EPHV donnent à penser que la substance toxique peut être un peptide acide. On utilise une CLHR à polarité de phase inversée avec une phase stationnaire C_{18} et un gradient d'élution par des mélanges eau-acétonitrile contenant 0,1 % d'acide trifluoro-acétique (TFA) pour supprimer l'ionisation des groupements carboxyle. La détection est assurée à l'aide d'un détecteur multicanal à diodes (DMC) qui permet l'acquisition continue des spectres UV et visibles. Une comparaison du profil en CLHR de la fraction toxique obtenue par

Figure 2
Chromatogrammes obtenus par CLHP des extraits de moules toxiques et témoins



L'extrait toxique donne un pic (TR de 12,5 min) qui n'est pas présent dans le cas de l'extrait témoin

EPVH sur colonne XAD-2 et de la fraction équivalente provenant des moules témoins est présentée dans la figure 2. Les premiers essais sont suivis par l'absorption de l'UV à 210 nm, puisque la plupart des peptides et des acides organiques absorbent à cette longueur d'onde. Le chromatogramme de la fraction toxique montre un pic unique au temps de rétention de 12,1 min (pic D). La région équivalente du chromatogramme témoin ne comporte pas ce pic.

Le spectre UV-visible obtenu à l'apex de ce pic montre un maximum unique d'absorption à 242 nm, ce qui laisse entendre que la molécule contenait deux doubles liaisons conjuguées. Il a été possible de recueillir des fractions correspondant au pic D, ainsi qu'à d'autres régions du chromatogramme, pour le dosage biologique et l'analyse chimique par CLHR préparatoire. Cependant, toutes les fractions obtenues au cours de la première série d'analyses préparatoires ont donné lieu à des effets toxiques, aussi bien dans le cas des échantillons témoins que dans celui des échantillons toxiques, bien que les symptômes aient été différents de ceux qui étaient provoqués par les extraits de moules toxiques. Ce problème de toxicité générale est résolu en remplaçant dans la phase mobile le TFA, qui est toxique pour les rongeurs, par l'acide acétique à 1 %. La fraction provenant du pic D s'est alors révélée seule toxique pour les souris, et les symptômes correspondaient. Toutes les autres fractions obtenues par extraction au méthanol aqueux sont non toxiques, même à une dose cinq fois plus forte en équivalents poids de tissu original. Lorsque la fraction toxique obtenue par CLHR est soumise à une EPHV, une bande jaune est observée au même endroit où l'on avait auparavant observé la présence d'un produit toxique. Les dosages biologiques réalisés avec des extraits aqueux de tranches de cet électrophorégramme montrent que seule la bande jaune est toxique. Réciproquement, la bande obtenue par EPVH préparatoire des extraits bruts donne en CLHP un pic présentant le même temps de rétention que le pic D et le même spectre UV. Le fait que des méthodes de fractionnement si différentes désignent le même facteur toxique milite fort pour la validité des résultats.

L'analyse des extraits de moules à l'aide d'un analyseur d'acides aminés traditionnel a révélé un pic inhabituel qui n'était présent que dans les échantillons toxiques. Ce pic correspond à une substance dont l'élution se fait entre la méthionine et l'isoleucine et qui, une fois coloré à la ninhydrine, absorbe fortement à 445 nm, ce qui indique un dérivé de la proline.

Les spectres infrarouges des premières fractions toxiques obtenues par les CLHR préparatoire étaient hautement variables, parce qu'ils dépendaient du pH auquel les pellicules étaient déposés. De plus, le spectre de la toxine était partiellement masqué par des bandes d'absorption attribuables à l'acétate ou au trifluoro-acétate, contaminants provenant soit de l'acide acétique soit de l'acide trifluoro-acétique utilisé dans les séparations chromatographiques. Ces deux difficultés ont été éliminées par l'utilisation d'une solution de HCl 0,1 M pour déposer les pellicules. L'acidification assure une protonation uniforme et complète des molécules de la toxine (sur la foi de l'absence de modifications spectrales ultérieures lors de l'évaporation à partir de quantités supplémentaires de HCl). Lorsqu'on obtient des échantillons plus purs de la toxine, les spectres IR ont des bandes d'absorption caractéristiques de COOH non ionisé (1215 et 1715 cm^{-1} et une large bande avec des maxima à 3000, 2750 et 2600 cm^{-1}), de COO^- ionisé (1400 et 1612 cm^{-1}), de NH_2+ (1565-1585 et 1950 cm^{-1}), de *trans*–CH=CH – (966 cm^{-1}), des groupes CH éthyléniques (3030 cm^{-1}) et de groupes CH aliphatiques (2980, 2935 et 2880 cm^{-1}).

La spectrométrie de masse (5M) à ionisation par bombardement d'atomes rapides donne un pic intense à m/z 312 dans les spectres d'ions positifs. Ce signal est absent des spectres des échantillons témoins qui, avec la présence d'un ion à m/z 310 dans les spectres d'ions négatifs, laissent prévoir une masse moléculaire de 311 Da pour la toxine. Un ion à nombre pair d'électrons à m/z 312 doit contenir un nombre impair d'atomes d'azote; de plus, la spectrométrie de masse en tandem indique au moins deux groupes carboxyle. La mesure de la masse précise au signal obtenu à m/z 312 donne une valeur de 312,146 ± 0,003 Da. Onze formules moléculaires peuvent correspondre à ce chiffre. Toutefois, vu les restrictions imposées par un nombre impair d'atomes d'azote plus au moins quatre atomes d'oxygène (au moins deux groupes carboxyle), les possibilités sont ramenées à seulement deux $C_{15}H_{22}NO_6$ seulement pour la molécule protonée. D'autres expériences de SM font pencher davantage vers un acide aminé tricarboxylique de formule moléculaire $C_{15}H_{21}NO_6$.

Les premières expériences de résonnance magnétique ^1H à l'aide du THF-d_8 donnent des spectres larges, bien qu'en rétrospective les résonances de l'acide domoïque soient identifiables. Les spectres en DMSO-d_6 montrent un composé en grande partie libre d'impuretés et possédant les caractéristiques d'un groupe méthyle vinylique (1,81 ppm, doublet). La proximité des protons oléfiniques H-5' et du groupe méthyle allylique est déterminée à partir de la multiplicité des pics de résonance et d'une expérience de COSY, ce qui a permis d'établir la structure partielle suivante : CH_3-CH-CH=CH-CH=C-CH_3.

Pendant toute l'analyse structurale, les données obtenues par spectroscopie UV, et IR, la SM et la RM sont constamment mises à jour pour servir à une recherche dans les *Chemical Abstracts* et dans le *Registry File* de la base de *STN International*. La structure partielle, les données toxicologiques et l'origine marine de la toxine évoquent d'abord une longue liste de composés. Cependant, au fur et à mesure que l'information sur la structure se précise, cette liste diminue rapidement pour ne laisser, comme candidats vraisemblables, qu'un acide aminé neuroexcitateur connu, l'acide domoïque, et ses isomères.

Pendant ce temps, les spectres de RM ^1H de la toxine deviennent plus nets lorsqu'on ajoute du D_2O à la solution de DMSO-d_6; dans le D_2O au pH 3,1, on obtient un spectre ^1H qui correspond en tous points (déplacement chimique à 0,02 ppm, constante de couplage à 0,2 Hz) aux données détaillées publiées sur l'acide domoïque[4,5], à ceci près que celles-ci ont été obtenues à un pH indéterminé. Il est dès lors évident que la spectroscopie IR et la SM de la toxine correspondent à la structure de l'acide domoïque, ce que des analyses spectrales supplémentaires confirment.

Bien que les séparations chromatographiques des extraits au méthanol aqueux ne révèlent aucune autre toxine, il était tout de même important de s'assurer que l'acide domoïque expliquait la totalité de la toxicité observée chez les moules originales. Dans les jours qui ont suivi, de nombreuses heures d'un travail très laborieux ont permis d'établir ce bilan de toxicité.

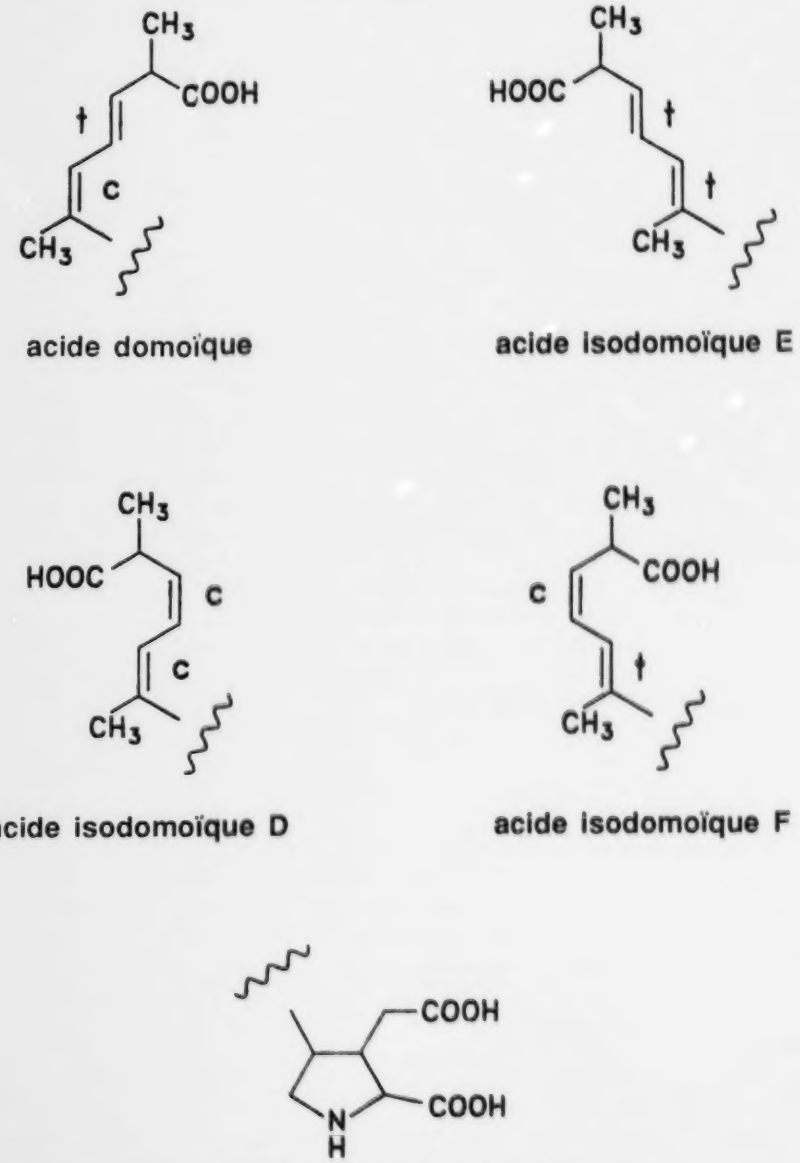
Un autre point doit être traité. L'acide domoïque a été reconnu pour la première fois dans des extraits bruts de certaines algues marines trouvées au Japon[6], et la médecine traditionnelle en a fait un remède pour lutter contre les vers intestinaux. En apparence, ce fait vient démentir l'idée que l'acide domoïque est une toxine. Toutefois, lorsqu'on tient compte des concentrations très élevées rencontrées dans les moules toxiques (jusqu'à 900 µg/g à l'état frais) et que l'on considère que des quantités allant jusqu'à 0,2-0,3 g peuvent être ingérées si ces moules sont consommées comme plat principal, la différence entre la dose thérapeutique et la dose toxique s'explique facilement.

La neurotoxicité de l'acide domoïque vient de ce qu'il est un agoniste puissant du glutamate[7]. Il peut être considéré comme une forme conformationnellement restreinte de l'acide glutamique qui perturbe la transmission neurochimique normale dans le cerveau en se fixant à certains récepteurs du glutamate des neurones. Il s'ensuit une stimulation continue de ceux-ci qui aboutit à leur rupture et à l'apparition de lésions.

Étant donné que l'acide domoïque n'a pas été décelé dans les moules ailleurs à l'Île-du-Prince-Édouard, il est peu vraisemblable qu'il constitue un produit métabolique de la moule elle-même. De plus, dans les coquillages toxiques conservés dans des réservoirs d'eau propre pendant plusieurs semaines, la concentration d'acide domoïque diminue progressivement, phénomène souvent observé dans les coquillages comestibles[8]. Bivalves filtreurs efficaces, les moules «traitent» d'énormes quantités d'eau par rapport à leur taille corporelle[9] et au moins une partie de la toxine accumulée dans leurs tissus pourrait provenir de concentrations faibles (non décelables) d'acide domoïque dans l'eau de mer. Toutefois, l'alimentation, probablement beaucoup plus que l'eau, expliquerait les quantités substantielles d'acide domoïque que l'on retrouve dans les moules contaminées. On estime que la quantité totale d'acide domoïque dans les moules provenant de la région touchée était probablement supérieure à 6 kg, la quasi-totalité de la charge corporelle en toxine se retrouvant dans les tissus de la glande digestive.

L'alimentation des moules de culture est constituée principalement de phytoplancton et de particules d'origine organique (des fragments de tissus d'algues marines provenant de macrophytes benthiques, matières organiques d'origine terrestre transportées dans l'environnement marin par les eaux de ruissellement). Des relevés de plancton effectués au début de décembre 1987 par L.A. Hanic (Université de l'Î.-P.-É.) a

Figure 3
L'acide domoïque et trois de ses isomères géométriques isolés dans les tissus de moules



Ces isomères peuvent aussi être préparés par photolyse de l'acide domoïque

révélé une intense prolifération d'une diatomée dans la région touchée. Cette diatomée a par la suite été identifiée comme *Nitzschia pungens* Grun. f. *multiseries* Hasle. Injectés à des souris, les extraits provenant d'échantillons de ce plancton ont produit des symptômes identiques à ceux qui ont été produits par les extraits de moules toxiques. On a même vu des restes reconnaissables de la coquille de *N. pungens* dans les glandes digestives engorgées de toutes les moules toxiques récoltées en décembre 1987; c'était également le cas des moules toxiques récoltées à la fin d'octobre et en novembre, bien qu'il n'existe pas d'information sur la composition du plancton à ce moment-là. Nous avons observé de l'acide domoïque dans le plancton provenant des régions touchées à des concentrations excédant parfois 1 % du poids sec[10], ce qui est suffisant pour expliquer les concentrations observées dans les moules toxiques. Cette indication très forte que *N. pungens* est la principale source d'acide domoïque chez les moules toxiques est renforcée encore par la mise en évidence de la production *de novo* d'acide domoïque par des cultures en laboratoire de *N. pungens* provenant de la région touchée[10,11].

Nous ne savons que très peu de choses de l'autécologie de *N. pungens*. Cette algue a une distribution presque mondiale, dans les eaux côtières[3], mais les données sur ses préférences en matière de température et de salinité sont basées en grande partie sur les données relatives à sa distribution. À notre connaissance, il n'existe pas de rapport antérieur indiquant que cette diatomée puisse donner lieu à des proliférations unialgales persistantes et denses. Si *N. pungens* proliférait dans l'est de l'Île-du-Prince-Édouard dès octobre 1987, ce qui semble avoir été le cas, il est difficile d'expliquer pourquoi elle a persisté et s'est même intensifiée au cours des trois mois d'octobre à décembre. Une des explications possibles réside dans les propriétés insecticides de l'acide domoïque[12], ce qui donne à penser qu'il pourrait également s'agir d'un antiappétant qui inhiberait le broutage par les crustacés planctoniques.

Nous avons conclu que cette diatomée constitue la principale source d'acide domoïque dans les glandes digestives des moules toxiques en provenance de la région de la baie Cardigan dans l'Î.-P.-É. vers la fin de 1987 et en 1988. Étant donné la distribution globale de *N. pungens* et de la très forte possibilité que d'autres algues microscopiques servent de source d'acide domoïque, la contamination des échantillons provenant de la région touchée doit avoir été liée à *N. pungens* faisant partie du plancton. La réapparition de *N. pungens* contenant de l'acide domoïque dans la baie Cardigan à la fin de l'automne 1988, ainsi que la mise en évidence de la production *de novo* d'acide domoïque par des cultures de *N. pungens* provenant de la région affectée, confirment cette conclusion.

Les analyses détaillées par CLHR et DMC des tissus de moules contaminées montrent au moins trois autres pics situés à proximité de celui de l'acide domoïque et qui présentent les mêmes spectres d'absorption UV. L'extraction sur une grande échelle et l'utilisation répétée de la CLHR a permis d'obtenir des quantités suffisantes de ces nouveaux produits pour que l'on puisse en faire une analyse structurale et biologique. Tous ces nouveaux composés sont en fait des isomères géométriques (fig. 3) de l'acide domoïque[13]. Il est facile de préparer ces isomères à partir de l'acide domoïque par irradiation ultraviolette[13], et comme leur présence est également constatée dans les extraits de phytoplancton, ils proviennent probablement de l'irradiation de l'acide domoïque par la lumière solaire.

Les différences de neurotoxicité entre l'acide kaïnique et l'acide domoïque[14], ainsi que le rapport récent[15] indiquant que l'acide acromélique A est encore plus puissant que l'acide domoïque incitent fortement à penser que la nature de la chaîne latérale est importante pour l'activité biologique du composé. Il était donc intéressant de comparer l'activité biologique de ces photo-isomères avec celle de l'acide domoïque. Nous avons étudié la force de liaison relative de l'isomère *cis, cis* avec la membrane prosencéphalique du rat et obtenu une valeur de CI_{50} de 100 nmoles comparativement à 5 nmoles pour l'acide domoïque lui-même. Ces données indiquent que les différences touchant la géométrie de la chaîne latérale peuvent réduire considérablement l'efficacité de la fixation généralisée à cette membrane.

Dans une série d'expériences par «voltage-clamp» sur des neurones en culture d'hippocampe de souris, on a mesuré les courants relatifs vers l'intérieur de la cellule provoqués par une brève exposition à l'acide domoïque ou à ses isomères. Les courants sont liés à une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions Na^+ et K^+ et provoqueraient une forte excitation des neurones.

On montre ainsi que la nature de la chaîne latérale a un effet très important sur l'activité du composé. Les expériences par «voltage-clamp» montrent la tendance suivante : acide domoïque > acide dihydrodomoïque > acide isodomoïque D (*cis:cis*) ~ acide isodomoïque F (*trans:cis*) > acide isodomoïque E (*trans:trans*). Une tendance semblable, mais non identique, s'observe dans le cas des études de liaison. Ces résultats mettent nettement en lumière la spécificité du récepteur du kaïnate pour certains substrats. Des travaux sont en cours à l'heure actuelle dans d'autres laboratoires pour isoler et caractériser la protéine constituant le récepteur; nos propres travaux actuels seront très précieux pour délimiter le site actif du récepteur du kaïnate et pourraient un jour conduire à l'élaboration d'un inhibiteur réversible ou d'un antagoniste capable d'éliminer les effets neurotoxiques de l'acide domoïque.

Références

1. (a) Association of Official Analytical Chemists. *Official method of analysis*. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists, 1984; 18.086-18.092
   (b) Adams WN, Miescier JJ. *Commentary on AOAC method for paralytic shellfish poisoning*. J Assoc Off Anal Chem 1980; 63: 1336.
2. Wright JLC, Boyd RK, de Freitas ASW, et coll. *Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island*. Can J Chem 1989; 67: 481-490.

3. (a) Hasle GR. *Nitzchia and Fragilariopsis species studied in the light and electron microscopes*. Videnskaps-Akademi Skr I Mat-Naturv Klasse Ny Serie 1965; No. 18.
(b) Hasle GR. *The group Pseudo-nitzschia*. Nova Hedwigia, Beih 1972; 39: 171-190.

4. Ohfune Y, Tomita M. *Total synthesis of domoic acid: a revision of the original structure*. J Am Chem Soc 1982; 104: 3511.

5. Maeda M, Kodama T, Tanaka T, et coll. *Structures of isodomoic acid-a, acid-b and acid-c, novel insecticidal amino acids from the red alga Chondria armata*. Chem Pharm Bull 1986; 34: 4982.

6. Takemoto T, Daigo K. *Constituents of Chondria armata*. Chem Pharm Bull 1958; 6: 578-580.

7. (a) Zaczek R, Coyle JT. *Excitatory amino acid analogues: neurotoxicity and seizures*. Neuropharmacology 1982; 21, 15-26.
(b) Shinozaki H, Ishida M. *Inhibition of quisqualate responses by domoic or kainic acid in crayfish opening muscle*. Brain Res 1976; 109: 435-439.
(c) Biscoe TJ, Evans RH, Headley PM, Watkins JC. *Domoic and quisqualic acids as potent amino acid excitants of frog and rat spinal neurones*. Nature 1975; 255: 166-167.
(d) Takeuchi H, Watanabe K, Nomoto K, Ohfune Y, Takemoto T. *Effects of alpha-kainic acid, domoic acid and their derivatives on a molluscan giant neuron sensitive to beta-hydroxy-L-glutamic acid*. Eur J Pharmacol 1984; 102: 325-332.

8. Ragelis EP. *Seafood toxins*. American Chemical Society Symposium Series 262. Washington, D.C., 1984.

9. Ward ME, Aiello E. *Water pumping particle filtration and neutral red absorption in the bivalve mollusk Mytilus edulis*. Physiol Zool 1973; 46: 157.

10. Bates SS, Bird CJ, de Freitas ASW, et coll. Pennate diatom *Nitzschia pungens as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island Canada*. Can J Fish Aquat Sci 1989; 46: 1203-1215.

11. Subba Rao DV, Quilliam MA, Pocklington R. *Domoic acid a neurotoxic amino acid produced by the marine diatom Nitzschia pungens in culture*. Can J Fish Aquat Sci 1988; 45: 2076-2079.

12. Maeda MT, Kodama T, Tanaka T, et coll. *Insecticidal and neuromuscular activities of domoic-acid and its related compounds*. Pesticide Sci 1984; 9: 27-32.

13. Wright JLC, Falk M, McInnes AG, Walter JA. *Identification of isodomoic acid D and two new geometrical isomers of domoic acid in toxic mussels*. Can J Chem 1990; 68(1): 22-28.

14. Angst C, Williams M. *Excitatory amino acid receptors*. Transmissions 1987; 3: 1-4.

15. Ishida M, Shinozaki H. *Acromelic acid is a much more potent excitant than kainic acid or domoic acid in the isolated rat spinal cord*. Brain Res 1988; 474: 386-389.

8. *Mesure de l'acide domoïque dans les fruits de mer et dans les tissus et les fluides biologiques*

J. F. Lawrence

Résumé

L'acide domoïque est extrait des tissus mous des moules en utilisant la méthode de l'*Association of Official Analytical Chemists* pour les toxines paralysantes des mollusques. Cette méthode consiste à faire bouillir l'échantillon pendant 5 minutes dans une solution 0,1*N* de HCl, puis à le refroidir et à le centrifuger. Un volume aliquote du surnageant est dilué de 10 à 100 fois avec de l'eau, filtré puis analysé par chromatographie en phase liquide inversée avec une phase mobile d'acétonitrile-eau (12:88) au pH de 2,5 et détection de l'absorption à 242 nm. La limite de détection est d'environ 1,0 mg/kg d'acide domoïque dans les échantillons de fruits de mer. La méthode a été utilisée avec succès en collaboration par divers organismes. L'analyse de 44 produits de fruits de mer achetés commercialement à l'extérieur de l'Île-du-Prince-Édouard n'a pas révélé de niveaux d'acide domoïque supérieurs à 1 mg/kg. La même méthode a été mise à l'essai sur l'urine et les fèces de singes et au sang humain (sérum). Elle est sans succès pour l'urine et le sang qui nécessitent un nettoyage supplémentaire avant l'analyse; elle donne de bons résultats pour les fèces aux niveaux d'acide domoïque supérieurs à 1,0 mg/kg.

Introduction

Au début de 1988, la Division de la recherche sur les aliments, en collaboration avec le Laboratoire de recherches de l'Atlantique du Conseil national de recherches à Halifax, a mis au point une méthode pour le dosage de l'acide domoïque dans les tissus de fruits de mer. Cette méthode est basée sur l'essai sur des souris à la recherche de l'intoxication paralysante par les mollusques déjà étudié en collaboration par l'*Association of Official Analytical Chemists* [1], qui s'est avéré applicable à l'acide domoïque à des niveaux supérieurs à environ 40 mg/kg dans les tissus humides de moules. Nous avons appliqué cette méthode à la détermination quantitative de l'acide domoïque par chromatographie en phase liquide à haut rendement (CLHR) et trouvé que des niveaux aussi faibles que 1 mg/kg peuvent être détectés. La méthode que nous décrivons ici s'applique aux fruits de mer et aux tissus

Figure 1
Chromatogrammes typiques de l'acide domoïque et d'échantillons de moules contaminées

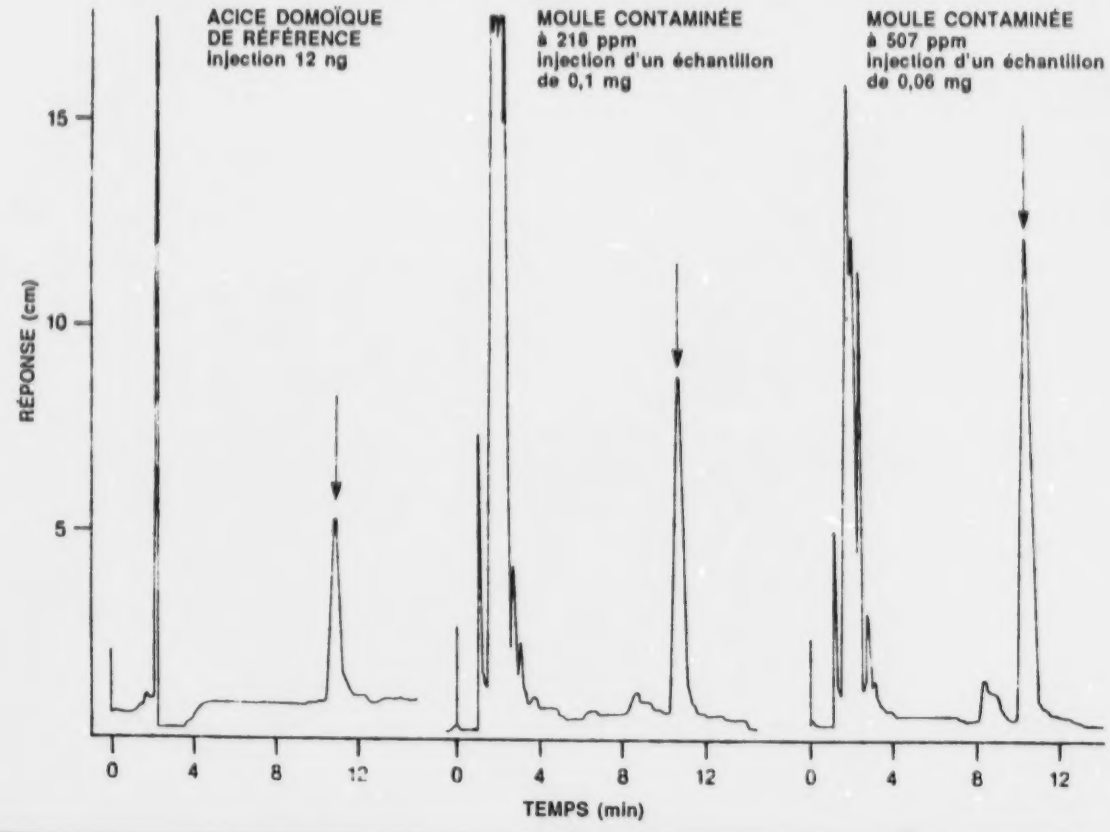
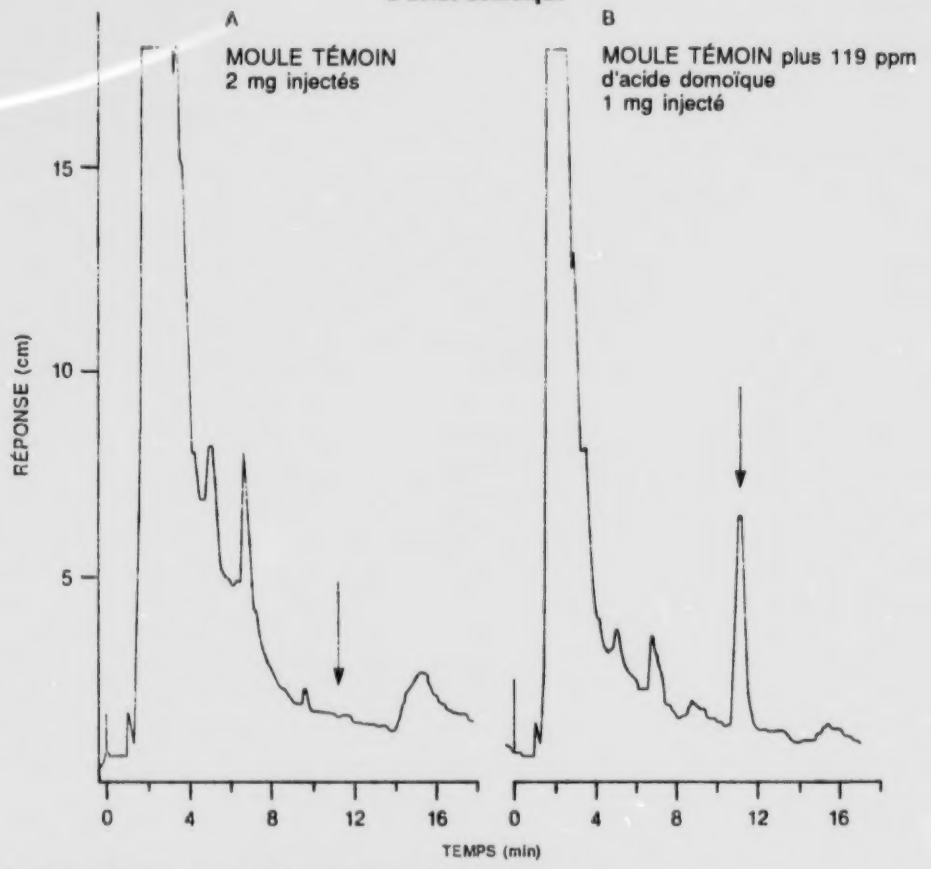
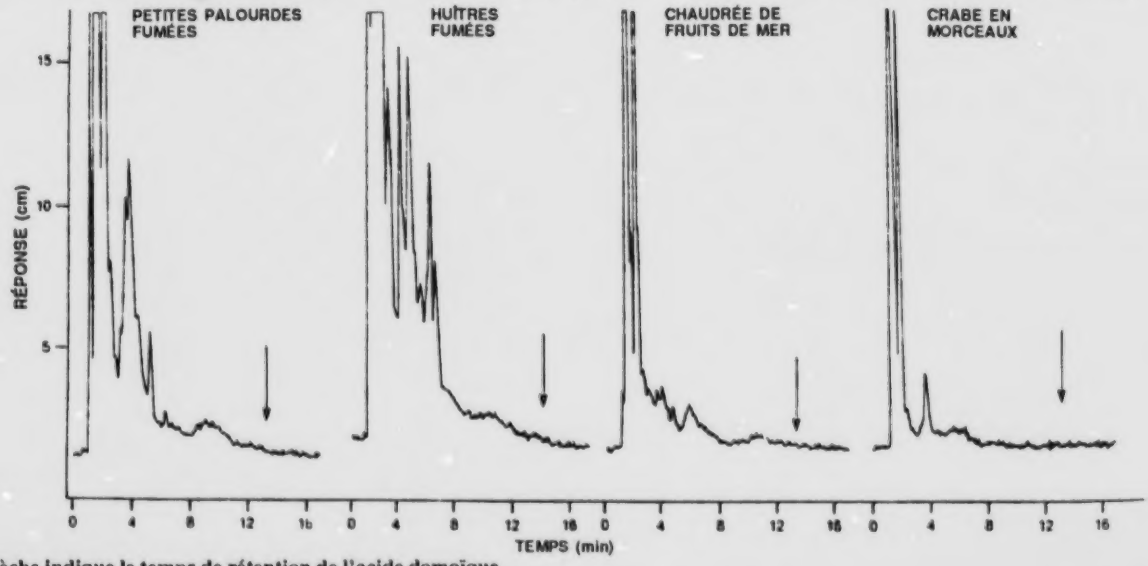


Figure 2
Chromatogrammes d'un échantillon de moule témoin et d'un témoin plus 19 mg/kg d'acide domoïque



La flèche indique le temps de rétention de l'acide domoïque

Figure 3
Chromatogrammes de divers produits de fruits de mer (injection d'un volume équivalent à 0,5 mg de l'échantillon)



La flèche indique le temps de rétention de l'acide domoïque

Tableau 1.
Échantillons de mollusques analysés pour l'acide domoïque

Moules	- fumées	**Chaudrées**	- palourdes
	- en sauce		- fruits de mer
	- en eau salée		
	- marinées	**Autre**	- crabe
	- dans le vinaigre		- crevette
			- pâté de homard
Palourdes	- petites		
	- fumées		
	- hachées		
Huîtres	- entières		
	- fumées		

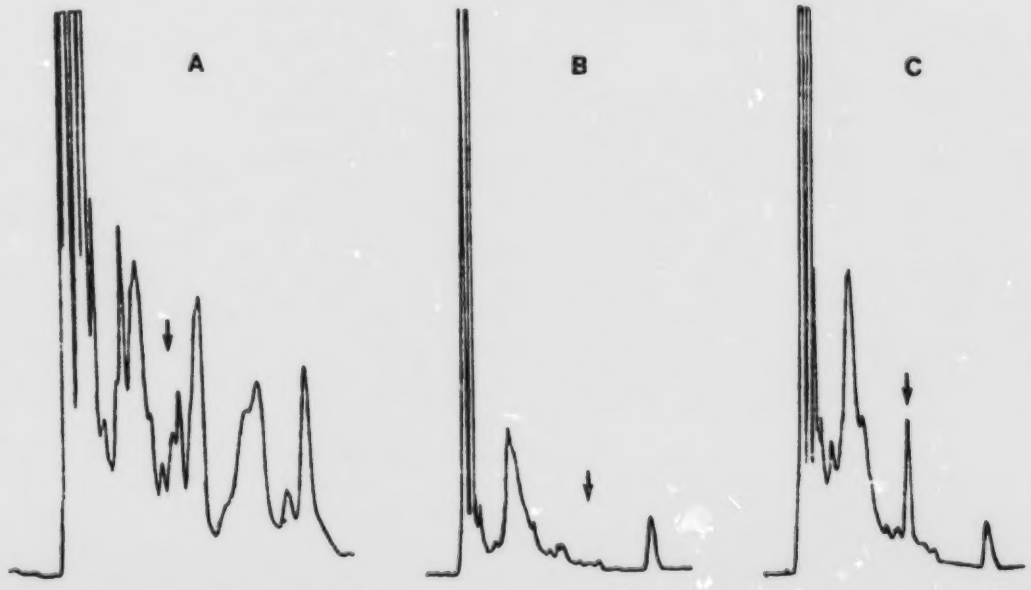
Tableau 2.
Résultats de l'étude en collaboration de l'acide domoïque

Nombre de laboratoires : 10
Nombre d'échantillons : 7
Concentration d'acide domoïque dans les échantillons :

A) 0
B) 14 ppm
C) 18 ppm
D) 100 ppm
E) 250 ppm

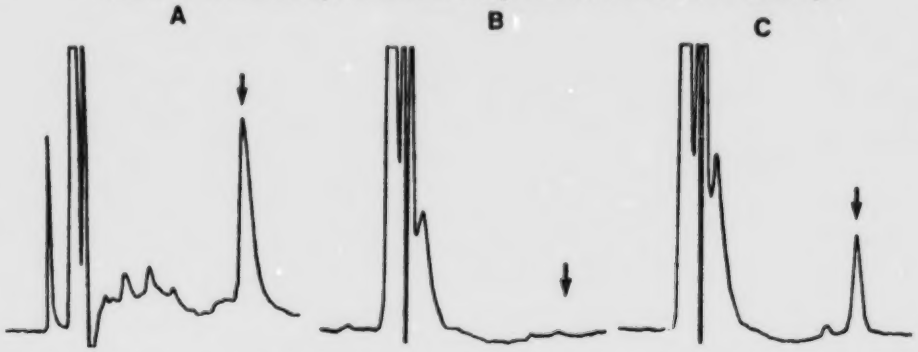
Pourcentage de récupération - Moyenne 72 p. 100
Nombre de chiffres hors tendance - 2 sur 70
Répétitivité dans le laboratoire (coefficient de variation) - Moyenne 3,4 p. 100
Répétitivité entre les laboratoires (coefficient de variation) - Moyenne 13,4 p. 100

Figure 4
Chromatogrammes d'un échantillon d'urine de singe avant (A) et après (B) nettoyage. Le chromatogramme (C) est celui d'une urine nettoyée comme en (B), puis additionné d'acide domoïque



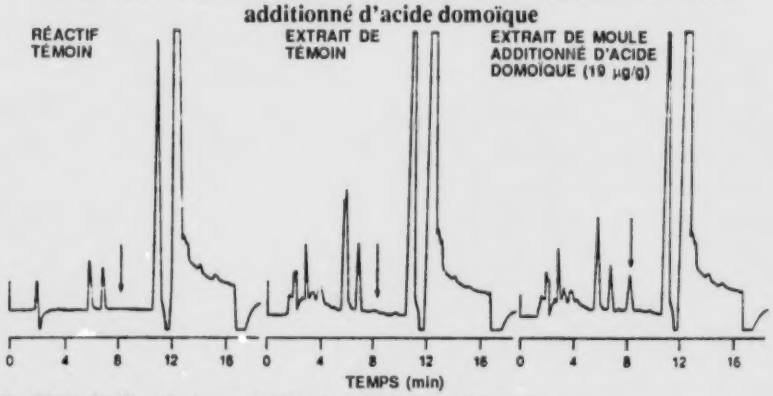
La flèche indique le temps de rétention de l'acide domoïque

Figure 5
Chromatogrammes d'un échantillon de sérum humain avant (A) et après (B) nettoyage. Le chromatogramme (C) est celui d'un sérum nettoyé comme en (B), puis additionné d'acide domoïque



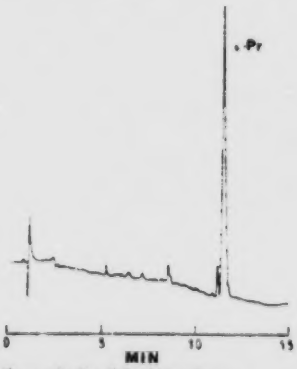
La flèche indique le temps de rétention de l'acide domoïque

Figure 6
Chromatogrammes après nettoyage et «dérivatisation» au PITC d'un réactif témoin, d'un extrait de moule témoin et d'un extrait de moule additionné d'acide domoïque



La flèche indique le temps de rétention de l'acide domoïque

Figure 7
Chromatogrammes d'un extrait de moule contaminée (308 mg/kg) après nettoyage et estérification



i-Pr = tri-ester isopropylique de l'acide domoïque

et liquides biologiques (urine, fèces et sang.

Protocole d'expérience

On isole l'acide domoïque des tissus mous des moules contaminées, on le purifie et le caractérise comme il a été décrit ailleurs[2,3]. Ceci constitue notre norme analytique.

La méthode d'extraction est exactement la même que celle décrite ailleurs[4]. En bref, on mélange 50 g de tissus de fruit de mer à un volume égal de HCl 0,1*N* et le fait bouillir tranquillement pendant 5 minutes. Le mélange est rapidement refroidi dans un réfrigérateur et le contenu ramené à un volume de 100 mL. Après centrifugation, on prélève un volume aliquote de surnageant pour le diluer de 10 à 100 fois, puis le filtrer pour l'analyse chromatographique.

Celle-ci est effectuée dans une colonne Supelcosil C18 avec une phase mobile d'acétronitrile-eau (12:88) à un pH de 2,5 (ajusté au moyen de H_3PO_4 à 2%) à un débit de 1,0 mL/min. La détection se fait par absorption ultraviolette à 242 nm.

Résultats et discussion

La figure 1 montre des résultats chromatographiques typiques obtenus à partir de moules contaminées de l'Île-du-Prince-Édouard, tandis que la figure 2 montre un échantillon témoin auquel on a injecté de l'acide domoïque à 19 mg/kg. Dans ces conditions, on peut détecter des doses d'acide domoïque inférieures à 2 mg/kg dans les mollusques et crustacés. La figure 3 montre les résultats typiques obtenus pour des produits de fruits de mer achetés dans la région d'Ottawa et énumérés au tableau 1. On analyse 44 échantillons différents de produits importés et locaux. On trouve que la méthode est bonne pour tous les échantillons de fruits de mer analysés.

Dans le but d'assurer la comparabilité des résultats des divers laboratoires pratiquant les analyses de l'acide domoïque, nous avons organisé et mis en route un programme de coopération entre eux. Le tableau 2 montre les résultats de cette étude. Seulement deux chiffres hors tendance sont rapportés et la méthode a un niveau de récupération acceptable dans le voisinage du niveau de référence de 20 mg/kg et une bonne répétitivité d'un laboratoire à l'autre pour toutes les concentrations étudiées. Ceci indique que les 10 laboratoires participants sont en mesure de produire des résultats équivalents pour l'acide domoïque.

La méthode pour les mollusques fut appliquée à l'analyse des fèces et de l'urine des singes. La méthode a bien marché pour les fèces mais nécessitait un nettoyage supplémentaire des échantillons pour l'urine. Le nettoyage comprenait la chromatographie de l'extrait acide sur colonne échangeuse d'anions, suivie de la chromatographie d'adsorption en phase inversée sur une deuxième colonne avant l'analyse de l'extrait par CLHR. La figure 4 montre quelques résultats typiques. Comme on peut le voir, les chromatogrammes B et C sont beaucoup plus nets que le chromatogramme A où aucun nettoyage n'avait été effectué. On a également utilisé le même protocole pour analyser le sérum d'un certain nombre de personnes hospitalisées à la suite de l'intoxication par l'acide domoïque. Les chromatogrammes semblaient très bons; dans certains cas, on a observé un pic indiquant la présence d'acide domoïque (figure 5). Cependant, lorsque les échantillons ont subi un nettoyage additionnel selon la méthode utilisée pour les échantillons d'urine, aucun pic n'est observé pour l'acide domoïque. Le pic obtenu d'abord ne représentait donc pas l'acide domoïque.

Plusieurs essais de confirmation chimique de la présence d'acide domoïque ont été mis au point. Ils impliquent la formation de dérivés hautement fluorescents ou absorbant les ultraviolets dont les caractéristiques chromatographiques et de détection diffèrent de celles du composé initial. La méthode reposant sur la formation d'un dérivé fluorescent au moyen du chloroformate de fluorenylméthyle a été mise au point par M.A. Quilliam du Conseil national de recherches à Halifax. Ce dérivé extrêmement fluorescent peut être détecté par CLHR à de très faibles quantités de l'ordre du pictogramme. Pour les analystes qui ne possèdent pas de détecteur de fluorescence, les dérivés absorbant l'ultraviolet obtenus par l'emploi de phényl-isothiocyanate (PITC) ou d'acide-isopropanol peuvent être utiles[5]. La figure 6 montre une confirmation utilisant du PITC, alors que la figure 7 montre une confirmation similaire utilisant de l'acide/propanol. Des niveaux aussi bas que 5 ppm d'acide domoïque peuvent être confirmés par ces méthodes.

Conclusion

L'acide domoïque peut facilement être dosé dans les mollusques, par la CLHR directe et la détection ultraviolette, à des niveaux supérieurs à 1 ppm. La même méthode est également utile pour les échantillons de fèces. Pour l'urine et autres liquides biologiques, un nettoyage préalable des échantillons est nécessaire. La détection de l'acide domoïque à des niveaux très inférieurs à 1 ppm nécessite une concentration plus poussée des échantillons, un nettoyage ou la formation de dérivés chimiques.

Références

1. Association of Official Analytical Chemists. *Official method of analysis*. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists, 1984.
2. Quilliam MA, Sim PG, McCulloch AW, McInnes AG. *High-performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton*. Int J Environ Anal Chem 1989; 36: 139-154.
3. Wright JLC, Boyd RK, de Freitas ASW, et coll. *Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island*. Can J Chem 1989; 67: 481-490.
4. Lawrence JF, Charbonneau CF, Menard C, Quilliam MA, Sim PG. *Liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish products using the paralytic shellfish poison extraction procedure of the Association of Official Analytical Chemists*. J Chromatogr 1989; 462: 349-356.
5. Lawrence JF, Charbonneau CF, Page BD, Lacroix GMA. *Confirmation of domoic acid in molluskan shellfish by chemical derivitazation and reversed-phase liquid chromatography*. J Chromatogr 1989;462: 419-425.

9. *La culture des moules et l'accumulation de l'acide domoïque*

G.R. Johnson, L. Hanic, I. Judson, P. Nijjar et A. Tasker

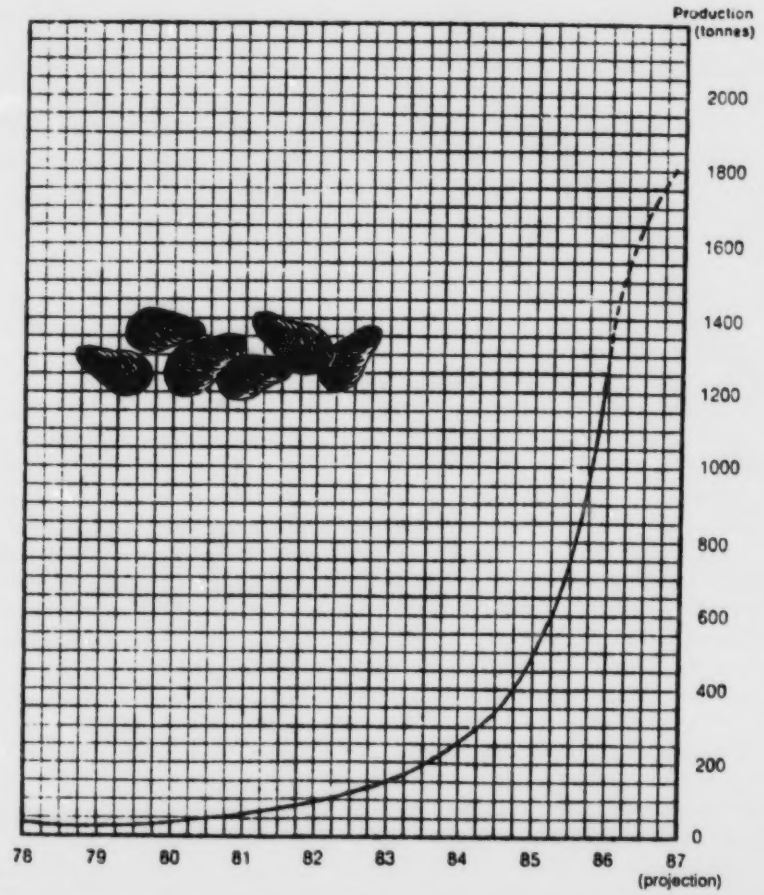
Résumé

L'industrie de la culture des moules (mytiliculture) de l'Île-du-Prince-Édouard n'avait jamais connu de problèmes de toxicité avant le mois de novembre 1987. Grâce au succès obtenu par la méthode de culture suspendue, la production annuelle de moules fraîches sur le marché alimentaire gastronomique avait presque atteint 3,2 millions de livres. La physiologie de ce bivalve sessile, sa façon de s'alimenter et sa localisation dans les estuaires le prédisposaient à l'accumulation d'une biotoxine largement répandue. L'est de l'Île-du-Prince-Édouard est devenu le centre de la contamination des moules par l'acide domoïque dès le 10 novembre 1987 (échantillons rétrospectifs) lors d'une floraison intense de la diatomée *Nitzschia*. Les moules ont pu accumuler d'importantes quantités d'acide domoïque sans en souffrir. Malgré les faibles températures de l'eau (inférieures à 4°C) et une couche de glace épaisse, les niveaux d'acide domoïque diminuèrent et ne purent être détectés au bout d'environ 6 semaines. L'année suivante, la toxine est détectée en quantités beaucoup plus faibles; les niveaux d'acide domoïque montrent une latence variable par rapport à l'augmentation de la concentration de *Nitszchia* dans la colonne d'eau. Les ventes de moules de culture de l'Île-du-Prince-Édouard ont rebondi à environ 140 p. 100 de la production antérieure à la contamination par l'acide domoïque.

Introduction

L'industrie de la mytiliculture dans l'Île-du-Prince-Édouard est une forme d'aquaculture dynamique et en pleine expansion, qui apporte, frais sur le marché, un produit gastronomique. Le présent article décrit comment cette industrie produit des moules, où est survenu le problème de l'acide domoïque, comment ces bivalves accumulent la toxine et ce que sont devenus les niveaux d'acide domoïque après cet incident dévastateur de 1987-1988.

Figure 1
Production de moules de culture de l'Île-du-Prince-Édouard, 1978-1987



L'industrie de la mytiliculture

Depuis la toute première expérimentation en 1975, cette mytiliculture n'a cessé de croître de façon exponentielle tout au long des années 80. Caractérisée par un esprit d'innovation et une mise en marché dynamique, dirigée presque exclusivement par des entrepreneurs, cette industrie a récolté 3,2 millions de livres de moules en 1988, ce qui représente une part importante de la production de moules de culture au Canada atlantique (figure 1). Ce marché ne semblait avoir aucune limite. Du fait qu'il n'y avait eu aucun antécédent d'intoxication paralysante par les mollusques dans l'est de l'Île-du-Prince-Édouard, il n'existait aucun programme de surveillance systématique.

La technique de cette culture, bien qu'elle ne soit pas tout à fait nouvelle, a connu de nombreuses adaptations pour devenir la meilleure méthode de culture suspendue qui soit utilisée aujourd'hui[1]. La vie des moules commence par la libération dans l'eau de mer du sperme et des oeufs de moules adultes

dioïques. Un certain nombre de stades motiles se déroulent en quelques semaines, jusqu'à l'apparition d'une moule miniature qui va s'attacher à tout ce qui est disponible[2]. Le naissain, fixé à des cordes de polypropylène, neuves ou ayant servi à la pêche du homard, qui sont suspendues à des lignes de fond, est récolté en septembre et placé dans des filets tubulaires en nylon jusqu'à ce que les moules se fixent par leur byssus. Les lignes de fond sont de lourdes cordes de nylon ancrées par les deux extrémités et suspendues dans la colonne d'eau au moyen de radeaux flottants de différentes tailles. Les filets tubulaires longs de huit pieds, remplis de naissain de moules de 3/4 de pouce à raison de 175 à 200 le pied linéaire, sont suspendus à la ligne de fond. Les prédateurs, tels que les étoiles de mer et les crabes, ne peuvent pas y accéder facilement.

Pendant les mois d'hiver, les lignes de fond sont immergées au fond de l'eau à l'aide de sacs de sable de façon à ce qu'elles ne soient pas endommagées par la glace. La récolte à travers la glace est devenue une spécialité de l'Île-du-Prince-Édouard; on extirpe les moules de la corde, on les transporte à l'usine pour les nettoyer, les débysser, les emballer et les livrer aux restaurateurs de n'importe quelle ville nord-américaine importante dans un délai de 2 à 6 jours.

Physiologie des moules

Les moules se déplacent vers l'extérieur du filet tubulaire, en ouvrant leurs valves pour tirer par filtration les algues de l'eau de mer. Une durée de séjour de 12 à 18 mois dans le filet tubulaire permet de produire une moule commercialisable de 50 à 70 mm. Dans les estuaires moins productifs, les moules peuvent demeurer deux ans dans les filets. Les moules cultivées ne peuvent pas fabriquer de «perle» (petit caillou caractéristique que rencontrent souvent les consommateurs de moules sauvages), parce que leur croissance est rapide et qu'elles sont commercialisées avant les trois années et demie nécessaires à l'apparition de ces perles.

Cette technique utilise au maximum la capacité biologique des moules. Elles sont économes d'énergie : d'une part, étant ectothermes, elles n'ont pas besoin de maintenir une température quelconque; d'autre part, elles se conforment à la composition osmolaire de leur milieu[3]. Leur comportement alimentaire est régi par la densité des algues dans l'eau; elles s'accommodent de la taille des particules consommées, qui varie de 2 à 90 microns. Elles sont fondamentalement sédentaires et acceptent leur place dans l'écosystème, poursuivant lentement leur croissance dans un milieu pauvre; mais lorsqu'elles sont déposées dans un endroit favorable de la colonne d'eau, elles se nourrissent avec voracité, siphonnant de 2 à 5 litres par heure et extrayant jusqu'à 98 p. 100 des algues disponibles[3]. Cette croissance rapide des moules cultivées donne des coquilles larges et minces et une chair bien pleine, le rapport entre la chair et la coquille dépassant 45 p. 100[4]. Leur composition en acides gras et la récolte à froid confèrent aux moules une saveur délicate et une valeur nutritive optimale[5].

Localisation géographique

Les estuaires les plus exploités dans l'Île-du-Prince-Édouard sont situés à son extrémité est. La plupart des eaux convenant à ce type de culture fait l'objet de concessions. Ces estuaires sont choisis pour diverses raisons : flux de marée favorable, protection contre le mauvais temps, faible mouvement de la glace et bonne profondeur (de 25 à 40 pieds). Ces estuaires entourés de chalets et de terres agricoles sont assez passants.

Le premier échantillon de moules toxiques date du 10 novembre 1987. Il avait été prélevé à la baie Sainte-Marie pour d'autres recherches et c'est rétrospectivement qu'il a été soumis à l'analyse. À cette époque, les deux grandes usines d'exportation transféraient une grande partie de leur récolte au fleuve Cardigan situé non loin de là. Ces moules ont commencé à arriver sur le marché au moment où les premiers cas de maladie étaient observés chez l'homme. Le 1er décembre, l'industrie de la mytiliculture de l'Île-du-Prince-Édouard, qui connaissait son premier désastre, avait fermé ses portes. Dès le 17 décembre, la neurotoxine en cause, l'acide domoïque, un acide aminé, avait été isolée; on démontrait qu'elle produit chez la souris le même tableau clinique que les extraits de moules toxiques[6]. Pour des raisons de commodité, on avait modifié à cette fin le protocole d'essai sur la souris qui était déjà en place pour la recherche de l'intoxication paralysante par les mollusques. On eut bientôt fait de recourir à la chromatographie en phase liquide à haut rendement pour isoler la toxine et en mesurer la concentration exacte. L'essai biologique a depuis lors été amélioré par le *Atlantic Veterinary College :* il tient maintenant compte des effets de faibles concentrations de la toxine, aussi bien que des convulsions et de la mort chez la souris (A. Tasker: communication personnelle, 1989) Cet essai permet de détecter de façon fiable des concentrations de l'ordre de 20 mg/ml. On peut désormais procéder à l'étude approfondie de la pharmacologie comportementale de l'acide domoïque.

Pendant qu'on cherchait la nature chimique de la toxine, les travailleurs sur le terrain constataient que plus de 90 p. 100 des algues disponibles pour ces moules sont des *Nitzschia*. Que ce soit à 6 miles au large des côtes ou dans l'estuaire, on trouve de l'acide domoïque dans ces algues[7]. Les moules se portent bien. Elles consomment effectivement les *Nitzschia*, comme l'a démontré l'étude histologique[8] : elles accumulent ainsi un grand nombre de gouttelettes intracytoplasmiques éosinophiles. La taille des cellules augmente considérablement. Les gouttelettes apparaissaient vertes en coupes épaisses colorées au bleu de toluidine; au microscope électronique leur densité est importante, elles ne semblent pas limitées par une membrane. Cette morphologie fait croire qu'il s'agit d'un phospholipide[9]. On n'a pas déterminé si ces gouttelettes contiennent ou non de l'acide domoïque. Il est possible qu'elles s'accumulent par suite de l'inhibition par l'acide domoïque du métabolisme normal.

L'excrétion ou l'absorption de ces gouttelettes coïncident avec une baisse du niveau d'acide domoïque dans les tissus, bien que l'on observe un temps de latence variable plutôt qu'une corrélation linéaire de la dégradation chimique et de la diminution morphologique des gouttelettes (L. Hanic: communication personnelle, 1989). Dans le fleuve Cardigan, même à des températures inférieures à 4°C, sous la glace, les niveaux d'acide domoïque dans les tissus diminuent assez vite : ils ont disparu en moins de 6 semaines.

Durant l'automne et l'hiver 1988-1989, la courbe de la toxicité est parallèle à la courbe des concentrations

de *Nitzschia* dans la colonne d'eau, pour un temps de latence allant jusqu'à 10 jours selon l'estuaire (J. Worms: communication personnelle, 1989). Les concentrations de *Nitzschia* ou d'acide domoïque sont beaucoup plus faibles que celles de l'année antérieure. Pêches et Océans a prélevé des échantillons et surveillé les rivières en 1988, et celles dont les niveaux atteignaient 20 mg/L (J. Worms: communication personnelle, 1989) étaient fermées.

Lorsque les moules sont revenues sur le marché, elles ont vite retrouvé la faveur des consommateurs : en 1988, les ventes représentaient 140 p. 100 de celles de 1987. Si on se base sur les mois réels de mise sur le marché des moules au cours de ces deux années consécutives, les expéditions mensuelles moyennes de 1988 étaient de 46 p. 100 plus élevées que celles de 1987. Le marché est sensible à la diffusion par les media de la moindre information sur ce phénomène de toxicité; les ventes peuvent accuser, en une nuit, des baisses de 40 à 50 p. 100 au moindre avis, puis remonter progressivement à des niveaux parfois supérieurs. Mais la baisse des prix a eu pour conséquence que les producteurs n'ont pas bénéficié de l'augmentation des marchés.

Références

1. Judson WI. *Mussel culture in Prince Edward Island.* Dans: *Aquaculture: a biotechnology in progress.* DePauw N, Jaspers E, Ackefors H, Wilkins N, éds. European Aquaculture Society, 1989.
2. Bayne BL. *The biology of mussel larvae.* Dans: *Marine mussels: their ecology and physiology.* Bayne BL, éd. London: Cambridge University Press, 1976; 121-206.
3. Bayne BL, Widdows J, Thompson RJ. *Physiology of marine mussels.* Dans: *Marine Mussels: Their ecology and physiology.* Bayne BL, éd. London: Cambridge University Press, 1976; 207-260.
4. Judson WI, Bernard T. *Mussel Monitoring Project.* Prince Edward Island Department of Fisheries, 1988.
5. Ablett RF, Gould SP. *Comparison of the sensory quality and quidatine rancidity status of frozen-cooked mussels (**Mytilus edulis** L.)* J Food Sci 198; 51(3): 809-811.
6. Addison RF, Stewart JE. *Domoic acid and the eastern Canadian molluscan shellfish industry.* Aquaculture 1989; 77: 263-269.
7. Bates SS, et coll. *Pennate Diatom Nitzschia as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island Canada.* Can J Fish Aquat Sci 1989; 46: 1-13.
8. Johnson GR, McNair N, Wagnar S. Conseil national de recherches Canada. *Domoic acid toxicity in the blue mussel, **Mytilus edulis**, of Eastern Prince Edward Island.* NRC IRAP Technical Report, 1989.
9. Johnson GR, Wagnar S. Conseil national de recherches Canada. *Morphometric analysis of cytoplasmic inclusions found in the digestive tubules of cells of toxic (domoic acid) mussels.* NRC IRAP Technical Report, 1989.

Discussion : Présentations n^os^ 7, 8, 9

Question provenant de la salle : J'ai une question destinée au D^r^ Lawrence. Je pense à ces deux épurations sur colonne que vous avez utilisées pour les échantillons d'urine et de sérum et je me demandais si vous pouviez nous indiquer dans quelle mesure ces opérations pouvaient diminuer la récupération.

J. Lawrence : Nous avons trouvé, je crois, une diminution d'environ 15 à 20 %. En d'autres mots, si vous faites l'épuration de l'acide domoïque, vous devriez récupérer de 80 à 85 % du produit, ce qui signifie qu'à partir d'une extraction initiale de seulement 75 %, vous finiriez avec environ 60 %. En fait, on peut jouer un peu avec la méthode et améliorer la récupération. Je crois que Mike Quilliam du CNRC obtenait, avec un type d'épuration très semblable, une récupération d'environ 90 % ou plus grâce à une seconde épuration.

H. Conacher : D^r^ Wright, vous avez indiqué que *Nitzschia* est la source de l'acide domoïque. Est-ce que l'acide kaïnique aussi est présent dans cet organisme?

J. Wright : Non, nous avons beaucoup cherché, mais n'avons rien trouvé à cet égard. En fait, j'aimerais revenir un peu en arrière pour dire que la culture de *Nitzschia pungens* que nous avons à notre disposition n'est pas exempte de bactéries. Ainsi, il est encore possible que ce soit une bactérie associée à *Nitzschia pungens* qui soit responsable de la production de l'acide domoïque. Mais il se trouve que des algues produisent un certain nombre d'agonistes du glutamate comme l'acide kaïnique et l'acide domoïque. J'ignore pourquoi il en est ainsi, mais c'est comme ça et ce fait est plutôt intéressant. De fait, une algue rouge très courante appelée *Palmaria palmata*, qui est considérée comme un mets très fin par les Japonais, est capable de synthétiser l'acide kaïnique. Le phénotype sauvage de l'algue ne produit pas cet acide, mais nous avons isolé certains mutants morphologiques spontanés de *Pulmaria* qui, eux, le fabriquent. On pense que la capacité de fabriquer l'acide kaïnique et l'acide domoïque pourraient être la manifestation d'un caractère ancestral, à savoir que les gènes qui commandent leur synthèse sont évidemment présents chez *Palmaria*, mais qu'ils ne s'expriment pas normalement; seuls certains mutants exprimeraient les enzymes permettant la synthèse de l'acide kaïnique. Je voudrais également revenir sur les propos de Frank Iverson au sujet de l'utilisation de l'acide kaïnique comme anthelmintique au Japon. Cette utilisation est aussi très courante en Chine. Nous avons dans notre laboratoire un scientifique originaire de Chine; nous avons profité du fait qu'il se rendait dans sa famille pour lui demander de ramener quelques échantillons de ces médicaments en poudre, ce qu'il a fait. L'algue qu'on utilise comme anthelmintique en Chine s'appelle *Digenia simplex*, et la poudre nous semblait devoir contenir de l'acide kaïnique. Cet acide a une activité plus faible que l'acide domoïque. Mais nous n'avons pas relevé la moindre trace d'acide kaïnique dans la poudre. Ainsi, de toute évidence, l'équivalent chinois de notre Ministère de la consommation et des corporations ne fonctionne pas si bien que ça: on nous dit qu'il s'agit d'un antihelmintique, mais n'y trouvons pas d'acide kaïnique ou d'acide domoïque comme ingrédients actifs.

Apparemment, cette situation est liée à la saison où l'on récolte *Digenia* : il s'agirait d'un produit saisonnier.

A. Novelli : Veuillez satisfaire ma curiosité, Dr Wright. Vous avez laissé entendre la possibilité qu'il y ait répression d'un gène pour la production de l'acide kaïnique et de l'acide domoïque chez les algues. Croyez-vous qu'il pourrait y avoir chez *Nitzschia pungens* une infection virale, plutôt qu'une infection bactérienne?

J. Wright : C'est une possibilité. Bien que nous ayons fait pas mal de microscopie électronique, mais je ne peux affirmer que nous avons écarté toute possibilité d'infection virale chez *Nitzschia*. J'essaie de me souvenir des résultats de ces travaux. Je ne crois pas que nous ayons trouvé de virus, mais je ne devrais même pas m'avancer plus loin sur cette question. C'est une possibilité.

10. Discussion du groupe d'experts : Faits qui incriminent l'acide domoïque comme la cause de l'épidémie de 1987

I. Hynie, J. Hockin, J. Wright, F. Iverson

I. Hynie : Les faits qui tendent à démontrer que l'acide domoïque est la cause de la poussée d'intoxications par des moules toxiques survenue en 1987 sont assez accablants et, comme ils ont été discutés ici de manière assez détaillée par différents intervenants, je me limiterai à une brève récapitulation :

- Toutes les moules consommées par les malades touchés au cours de cette épidémie provenaient de deux zones d'exploitation dans la baie Cardigan, Î.-P.-É.
- Les moules «toxiques» de ces deux zones d'exploitation ont présenté les plus fortes teneurs en acide domoïque de toutes les moules examinées dans l'Î.-P.-É.
- Tous les symptômes toxiques chez le rat et la souris causés par les extraits de moules toxiques ont été reproduits, qualitativement et quantitativement, par des extraits non toxiques de moules normales auxquels on a ajouté une quantité équivalente d'acide domoïque.
- Aucune fraction des différents extraits provenant des moules toxiques, autre que celle qui contenait l'acide domoïque, n'a démontré de propriétés toxiques au cours des expériences effectuées chez les animaux.
- Le syndrome observé chez les humains est extrêmement variable, mais chacun des symptômes cliniques de la maladie concorde avec les résultats expérimentaux obtenus avec l'acide-kaïnique, l'acide domoïque ou les deux.
- Les manifestations neuro-pathologiques observées chez quatre patients qui sont décédés sont spécifiques et ressemblent de manière étonnante aux constatations faites chez les animaux d'expérience intoxiqués par l'acide domoïque.

Notre tâche consiste maintenant à confronter ces faits avec quelques problèmes que nous ne pouvons ignorer :

1. La méthode épidémiologique normale consiste à reconnaître les cas suspects par un ensemble de critères et à faire des vérifications en laboratoire. Au moment de l'épidémie, nous ne savions pas ce que nous cherchions; plus tard, lorsque nous l'avons su, nous n'avions plus d'échantillons d'urine ou de matières fécales à notre disposition. Par conséquent, on n'a jamais reconnu la présence de l'acide domoïque dans les tissus ou les excreta humains.
2. Notre définition d'un cas suspect se limitait aux personnes qui avaient mangé des moules de l'Î.-P.-É. Par conséquent, le fait d'avoir consommé des moules de l'Î.-P.-É. ne peut être utilisé comme preuve que rien d'autre ne peut être en cause.
3. Les personnes malades ont ingéré moins de 10 mg d'acide domoïque par kg de poids corporel, et certaines n'en ont probablement ingéré que 1 ou 2 mg/kg. Bien que ces doses soient hautement toxiques chez la souris en injection parentérale, le rat et la souris peuvent tous deux tolérer 50 mg/kg d'acide domoïque *per os* sans présenter le moindre effet toxique.
4. Pour chaque cas symptomatique, on compte environ 500 personnes qui ont mangé les moules toxiques sans subir d'effets défavorables. Il semble même que certains des cas les plus graves sont survenus à la suite d'un repas qui n'a causé aucun désagrément à d'autres personnes partageant la même table au restaurant.
5. Les extraits d'algues riches en acide domoïque sont utilisés au Japon comme médicaments-maison contre certaines maladies parasitaires et ce, depuis des siècles. Dans ce pays, on a même essayé l'acide domoïque purifié chez des enfants (dose totale de 6-20 mg) sans que l'on obtienne d'effets défavorables.

Comme le fait d'avoir consommé des moules riches en acide domoïque faisait partie de notre définition d'un cas, j'aimerais adresser ma première question au Dr Hockin. A-t-on reconnu des cas de personnes qui, plus tard, ont été écartées de l'étude parce qu'elles n'avaient pas consommé de moules?

J. Hockin : Oui, vous mettez en lumière le principal biais dans le type d'information que nous avons recueilli, du fait que notre définition de cas se limitait aux personnes ayant consommé des moules de l'Î.-P.-É. Nous avions établi notre définition de cas afin de dépister d'autres personnes qui étaient malades au début de décembre 1987, et nous avons voulu qu'elle soit suffisamment restrictive pour éviter que soient incluses dans l'étude toutes les personnes ayant éprouvé des symptômes gastro-intestinaux mineurs dans les 24 h ayant suivi la consommation de moules. Nous craignions d'être submergés par le nombre de cas qui nous auraient été signalés de personnes malades après avoir consommé des moules ou d'autres types de coquillages. De fait, le L.L.C.M. et les gens au niveau local ont reçu des rapports concernant des cas de maladie reliées à toutes sortes de produits, mais il s'agissait d'un nombre de cas assez faible et on n'a pas trouvé de personnes gravement malades qui avaient consommé d'autres produits. Autrement dit, personne parmi les gens qui avaient consommé autre chose que les moules de l'Î.-P.-É. ne semblait présenter le syndrome neurologique. Je crois que si nous nous limitons aux personnes gravement malades, nous en avons beaucoup qui ont mangé des moules de l'Î.-P.-É., alors que nous n'en avons aucune parmi celles qui ont consommé autre chose au cours de la même période. Il n'y avait donc nul besoin de pousser plus loin l'enquête épidémiologique pour déterminer la relation entre les cas et les non-cas.

I. Hynie : Est-il raisonnable de dire que les cas neurologiques, ou les malades qui présentaient des symptômes neurologiques, ont tous été liés aux moules toxiques, tandis que les malades ne présentant que des symptômes

gastro-intestinaux peuvent avoir ou n'avoir pas tous été reconnus, et que nous ne le saurons jamais?

J. Hockin : Les symptômes gastro-intestinaux inclus dans la définition de cas sont passablement «non spécifiques». Il pourrait y avoir d'innombrables autres causes, y compris d'autres toxines de coquillages, des bactéries, des virus, des allergies alimentaires et ainsi de suite; et nous pensions que si, dans la définition de cas, nous avions laissé la porte ouverte à la consommation de n'importe quel coquillage, nous aurions facilement pu inclure dans notre étude un certain nombre de ces autres cas. Mais il n'en était pas ainsi pour les symptômes neurologiques: si quelqu'un connaît des personnes qui ont perdu la mémoire après avoir consommé autre chose que des moules, dans les mêmes circonstances, j'aimerais bien le savoir.

I. Hynie : Le revers de la médaille est, évidemment, le fait que certaines régions ont probablement fait l'objet d'une sous-déclaration. Par exemple, les États-Unis où l'on n'a signalé aucun cas et, pourtant, d'après les premiers chiffres sur les expéditions de moules toxiques, il fallait s'attendre qu'un certain nombre de cas surviennent dans ce pays; ils n'ont tout simplement pas été reconnus. Si l'on admet une proportion de un à trois cas par millier de portions, on aurait pu s'attendre qu'il y ait aux États-Unis un nombre de cas variant entre 10 et 20 cas, je crois. De sorte que le nombre de cas serait en réalité biaisé vers le bas plutôt que vers le haut.

J. Hockin : Oui, il y a vraisemblablement eu sous-déclaration, même des cas graves. D'après les chiffres de vente rassemblés par Gerry Johnson sur le volume aux États-Unis, on aurait pu s'attendre à 15 à 20 déclarations en provenance des États-Unis, si le système de surveillance américain avait été aussi efficace que celui du Québec où l'on a enregistré environ 2,2 cas par 1000 portions de moules provenant de l'Î.-P.-É. Le rapport entre le nombre de cas et la quantité de moules expédiées est légèrement plus faible en Ontario, qui a reçu sensiblement la même quantité de moules que les États-Unis; on a signalé un petit nombre de cas dans cette province. Le fait que l'on n'a pas signalé de cas aux États-Unis et le fait que l'on a obtenu un nombre de cas relativement faible en Ontario seraient attribuables, je crois, à une recherche des cas moins diligente que dans la province de Québec et dans les Maritimes.

I. Hynie : Supposons que le lien qui existe entre les moules provenant d'une région particulière et la maladie soit aussi fort qu'il puisse l'être dans les circonstances. Le groupe d'Halifax a isolé l'acide domoïque dans ces moules et je ne crois pas qu'il y ait de doute sur le fait que ce que vous avez isolé est bel et bien de l'acide domoïque. La question que l'on peut alors se poser est la suivante : quelque chose aurait-il pu vous échapper? Vous avez déjà assez bien cerné cette question, mais accepteriez-vous de revoir brièvement non pas les faits qui démontrent que l'acide domoïque était présent, mais plutôt les faits qui démontrent que rien d'autre n'était présent?

J. Wright : Il est certain que jusqu'à présent nous n'avons rien trouvé d'autre. Il est évident que nous avons étudié très sérieusement cette question. Dès décembre nous avions une fraction active qui était toxique et nous concentrions nos efforts sur l'acide domoïque; mais, de toute évidence, nous voulions nous assurer que l'acide domoïque était bien le seul composé en cause. Nous avons examiné le début du chromatogramme, tout ce qui a été élué de la colonne depuis le temps zéro jusqu'à la fin de l'expérience de chromatographie; nous avons même «décortiqué» le pic de l'acide domoïque, le découpant jusqu'à sa base, et nous n'avons rien trouvé : aucune activité en dehors du pic de l'acide domoïque. Lorsque nous sommes retournés en janvier, nous avons construit une courbe du temps jusqu'au décès beaucoup plus raffinée. Lorsque nous avons comparé l'acide domoïque pur avec des extraits de moules et des moules témoins (et nous avons procédé à divers types d'extraction des moules), la courbe du temps jusqu'au décès était presque identique pour toutes les expériences, qu'il s'agit de l'acide domoïque pur ou des extraits de coquillages, fait avec de l'eau, avec de l'acide ou quoi encore. Nous sommes très confiants d'avoir prouvé que l'acide domoïque est cause de la toxicité. Le travail que nous effectuons actuellement sur les isomères de l'acide domoïque indiquerait qu'effectivement, il y a une toxicité périphérique reliée au pic original d'acide domoïque dans les moules, mais que cette toxicité n'est pas importante, (a) parce que ces composés sont présents dans une proportion de 1 % à environ 8 % comparativement à la concentration totale d'acide domoïque, et (b) leur toxicité est plus faible d'au moins un ordre de grandeur. Nous sommes donc bien sûrs que l'acide domoïque est effectivement la cause de la toxicité des moules.

I. Hynie : Vous parlez, bien entendu, du modèle chez la souris, par voie intrapéritonéale, et vous dites être raisonnablement certains qu'il n'y a rien d'autre dans les moules qui pourrait intoxiquer la souris par suite d'une injection parentérale.

J. Wright : Certes, avant de nous intéresser aux composés hydrosolubles, nous avons passé quelques jours à examiner les composés liposolubles et nous ne sommes pas parvenus à tuer des souris avec quoi que ce soit provenant des fractions liposolubles; croyez-moi, nous vous avons envoyé, à vous et à Todd, des fractions qui étaient vraiment chargées et nous avons pipé les dés en notre faveur pour essayer de tuer certaines souris, et nous en avons été absolument incapables. Je voudrais ajouter que nous avons trouvé dans les glandes digestives un profil de pigments complètement différent chez les moules témoins et chez les moules toxiques. Non seulement l'apparence était différente, mais comme Gerry Johnston l'a signalé, l'odeur aussi était différente. En fait, ils sont différents et reflètent très certainement le régime alimentaire.

I. Hynie : Passons maintenant à la question suivante. Le problème formulé par certaines personnes, si je comprends bien, est d'abord et avant tout l'allégation des Japonais selon qui l'acide domoïque n'est pas toxique pour les humains. Il est difficile de trouver des données dans la documentation scientifique provenant du Japon sur ce qui a vraiment été fait chez les humains. Il y a un certain nombre de données sur les expériences réalisées dans ce pays chez le rat et la souris. Ils correspondent assez bien avec ce que vous avez entendu ici aujourd'hui. En ce qui a trait à l'expérimentation humaine au Japon, la seule chose que nous ayons trouvée, et peut-être que quelqu'un ici pourrait être en mesure d'en extraire plus d'information, c'est qu'ils ont fait trois

essais. Deux fois ils ont administré des doses totales de 6 à 8 mg à un groupe constitué d'environ 10-15 enfants. On ignore leur âge. Dans une troisième expérience, ils ont administré une dose totale de 20 mg et ils en ont conclu qu'il n'y a pas d'effets secondaires. Les Japonais prétendent également que pendant des centaines d'années, leurs pêcheurs ont consommé des extraits d'algues marines pour traiter différentes maladies parasitaires intestinales, algues marines devant contenir soit de l'acide kaïnique, soit de l'acide domoïque, et que ce remède n'est pas toxique. Le hic, c'est qu'évidemment, si au départ vous admettez que l'extrait d'algues marines n'est pas toxique et qu'un pêcheur dans un village quelconque meurt, vous ne songez pas à incriminer les algues marines puisque le produit n'est pas réputé toxique, alors il faut que ce soit autre chose. On se trouve à perpétuer la notion que l'algue n'est pas toxique. Nous ne pouvons toutefois ignorer le fait qu'il est à peu près impossible, ou du moins très difficile, d'intoxiquer un rat ou une souris *per os* par des moules toxiques ou l'acide domoïque. Nous n'avons pas de données chez les humains; la seule chose qui vienne en quelque sorte soutenir notre thèse, ce sont les expériences réalisées chez le singe qui montrent qu'effectivement une dose *per os* est suffisante. Frank, auriez-vous des observations à faire sur les différences entre la dose buccale et la dose parentérale et sur les différences interspécifiques?

F. Iverson : Bien, j'ignore ce que je pourrais ajouter, la question étant très bien résumée ici. Mais, effectivement, nos résultats sont sensiblement les mêmes en ce qui a trait à la toxicité aiguë par voie intrapéritonéale dont a parlé Jeff Wright. Il est certain que nous n'avons rien trouvé d'autre que l'acide domoïque. Disons simplement que l'acide domoïque à la concentration observée dans les moules toxiques peut certainement expliquer tous les symptômes qui ont été observés. Pour ce qui est des travaux des Japonais, je pourrais faire plusieurs observations : je n'ai pas plus de données que vous, Ivo, mais je pense qu'on nous a dit déjà que nous ne savons pas combien d'acide domoïque il y a dans ces remèdes-maison. Ainsi, je peux seulement commenter l'expérience où les Japonais ont administré des doses de 20 mg à des enfants. Cela équivaut, selon le poids, à environ 0,3 à 0,7 mg par kg. Chez les primates, si nous administrions environ 0,5 mg, nous n'obtenions aucun effet. Du mieux que nous puissions le déterminer, il semble que dans certains cas humains, la quantité ingérée aurait facilement pu être dix fois plus grande. Ainsi, il s'agit d'une question de quantité consommée et je pense que la quantité d'acide domoïque était bien là.

I. Hynie : Je crois que le Dr Perl a cité certains chiffres en commençant par une dose totale de quelque chose comme 50 mg chez les adultes, ce qui équivaut à moins de 1 mg par kg et déjà, cette concentration était toxique. Cela signifierait, si vous avez raison, que les Japonais sont venus bien près d'une dose toxique.

Question provenant de la salle : D'après les données obtenues chez la souris, il est assez courant de voir d'un animal à l'autre une différence de l'ordre de 4-5 fois avant que l'on puisse voir une réaction. Ainsi, on peut facilement imaginer que l'on puisse trouver la même variabilité chez les humains. C'est l'effet du vieillissement qui constitue, à mon avis, l'élément le plus révélateur dans les cas humains; et les données portant sur les animaux montrent une augmentation de la sensibilité aux toxines avec l'âge, particulièrement dans le cas de l'hippocampe: vous obtenez, surtout avec l'acide kaïnique, une mort cellulaire qui survient chez les animaux aux endroits précis qui sont affectés par le vieillissement.

F. Iverson : Oui, l'effet de l'âge est certainement important et nous y reviendrons un peu plus tard. Je crois que l'une des difficultés soulevées ici vient du fait que certaines des données japonaises portent sur des rongeurs et je crois que nous savons, du moins à partir de certaines des données que j'ai présentées ici ce matin, que les rongeurs n'absorbant tout simplement pas le produit s'il est administré *per os*, ils constituent un mauvais choix d'espèce pour l'extrapolation des données aux humains. Je tiens à préciser encore une fois que nos expériences ne sont pas encore terminées. Nous n'avons réalisé qu'un seul essai chez des primates, et nous avons pu voir des effets que nous n'aurions pas commencé à soupçonner chez les rongeurs à des concentrations sensiblement égales aux doses auxquelles ont été exposées au moins certaines des personnes ayant consommé des moules. Il y a absorption, et tout ceci est probablement une question d'absorption. Il s'agirait donc d'une différence d'espèce et je pense que cette idée apparaîtra encore plus clairement au fur et à mesure que nous aurons plus de données. Ce matin, j'ai évoqué 3, 4 ou 5 raisons différentes pour lesquelles les humains seraient prédisposés à ce phénomène, et je ne crois pas qu'il y ait ici quoi que ce soit qui indique que quelque chose d'autre que l'acide domoïque soit un composé toxique. On pourrait explorer la possibilité qu'il y ait absorption avec quelque chose d'autre; ainsi pourrions-nous formuler l'hypothèse que quelque chose d'autre vienne faciliter l'absorption ou que quelque chose d'autre, comme un autre acide aminé, vienne accroître la toxicité. Ce sont là toutes des possibilités sur lesquelles nous n'avons pas encore de données précises à l'heure actuelle, mais rien n'indique que l'effet prévu soit causé par autre chose que l'acide domoïque.

I. Hynie : J'aimerais passer à une autre question. J'ai affirmé que les personnes malades présentent certains symptômes qui, je crois, peuvent se comparer à ceux que l'on a obtenus au cours de l'expérimentation animale et j'aimerais demander au Dr Teitelbaum si elle peut faire quelques commentaires sur ce qu'elle a elle-même vu des symptômes neurologiques chez les malades, comparativement à la situation observée chez les animaux. Malheureusement, je ne crois pas qu'il y ait grand chose à dire au sujet des singes, mais on peut au moins constater que la dose nécessaire est beaucoup plus faible.

J. Teitelbaum : Probablement que la plus grande ressemblance se situe au niveau des convulsions et des mouvements anormaux que l'on a observés chez les êtres humains, à savoir des mouvements de mastication, des myoclonies et des crises. Ce sont toutes des manifestations que l'on a signalées chez les animaux qui ont reçu de l'acide kaïnique ou de l'acide domoïque. Quant aux anomalies de la mémoire, nous n'avons pas de comparaison à l'heure actuelle avec les animaux et il faudra étudier l'apprentissage chez les animaux

avant de pouvoir répondre à cette question. Beaucoup ont soutenu qu'il est possible que ce que nous avons trouvé chez les êtres humains n'avait rien à voir avec l'acide domoïque en soi et qu'il s'agirait plutôt d'une maladie aiguë touchant des sujets hypotendus et que, l'hippocampe étant très sensible à l'ischémie, les troubles de mémoire observés, ainsi que les lésions de l'hippocampe, pourraient bien en découler. Je crois que c'est très peu probable. Je crois avoir démontré que certains patients n'avaient jamais souffert d'hypotension et qu'on ne trouvait chez eux aucun autre facteur de risque capable d'expliquer les pertes de mémoire incroyables que nous avons constatées, et c'est à peu près le seul argument que nous ayons à l'heure actuelle. L'autre question est celle de l'axonopathie motrice. On trouve dans la documentation scientifique certaines données indiquant que les motoneurones sont affectés par l'acide kaïnique et par l'acide domoïque et que cette région de la moelle épinière est relativement résistante aux lésions ischémiques; les arguments relatifs à l'ischémie ne tiendraient pas non plus dans le cas de la moelle épinière.

I. Hynie : J'ai également fait état de la similitude qui existe entre l'homme et les animaux en ce qui a trait aux modifications neuropathologiques observées à l'autopsie. Maintenant, j'aimerais inviter le Dr Carpenter ici, pour la bonne raison que son exposé devant avoir lieu demain, il n'a pas encore eu l'occasion de prendre la parole. J'aimerais simplement qu'il vienne nous dire rapidement si ce que j'ai dit aujourd'hui concorde avec ce qu'il viendra nous dire demain.

S. Carpenter : Premièrement, ce que j'ai vu dans les quatre cas est très stéréotypé; ces quatre malades qui sont décédés après l'ingestion de moules, à des intervalles de temps variables, ont tous semblé présenter des lésions semblables, presque identiques, bien que légèrement moins prononcées dans un cas. Deuxièmement, de quoi d'autre pourrait-il s'agir? On pense à la possibilité d'une hypotension et d'une ischémie. Ces manifestations étaient certes présentes chez au moins deux des cas, et probablement que trois d'entre eux souffraient effectivement d'hypotension, mais non pas au début de l'évolution de la maladie. Si la cause avait été l'hypotension, alors oui, on aurait pu s'attendre à des lésions de l'hippocampe. Mais l'on n'aurait pu s'attendre à ce que les noyaux amygdaliens présentent des lésions aussi prononcées que ce que l'on a vu; on n'aurait pas non plus observé de lésions dans l'avant-mur ni dans la région située en dessous des noyaux gris centraux — appelons-la la région du tubercule olfactif -; je ne m'attendrais pas du tout à cela dans le cas de l'ischémie, c'est pourquoi cette dernière n'apparaît pas comme une très bonne explication de ce que nous avons vu. Je ne peux penser à autre chose. Maintenant, si nous comparons ces observations avec les résultats de l'administration de l'acide kaïnique aux animaux, les lésions observées sont très, très semblables. Les manifestations au niveau de l'hippocampe, je crois, sont très semblables à ce que l'on a vu par suite de l'administration de l'acide kaïnique par voie générale. Si vous mettez de l'acide kaïnique dans le ventricule, vous obtenez des lésions surtout dans l'aire CA3 et je n'ai pas observé ces lésions. Il y a des lésions qui s'étendent à tout l'hippocampe, mais en épargnant, de manière relative, la région CA2. Par contre, d'après ce que j'ai lu sur l'administration de l'acide kaïnique par voie générale à un animal, le premier jour de l'administration, l'aire CA3 est la région la plus touchée, mais si vous regardez après trois jours et plus, les lésions dans la région CA1 sont au moins aussi importantes; ce qui correspond assez bien à ce que nous voyons. Par conséquent, les lésions se situent dans la même région que celles qui sont provoquées par l'administration de l'acide kaïnique par voie générale et je ne trouve rien d'autre pour les expliquer.

I. Hynie : J'aimerais poser une question qui s'adresse à tout le monde. Est-ce que quelqu'un ici pense qu'il y a quelque chose que nous aurions négligé de considérer et qui pourrait constituer une preuve que l'acide domoïque est bel et bien responsable des cas de maladie ou, deuxièmement, qu'il pourrait y avoir une autre explication à toute cette situation et, qu'en fait, l'acide domoïque pourrait ne pas être en cause?

A. Novelli : Bien, je pense que l'ischémie pourrait même être aggravée dans cette situation provoquée par l'acide domoïque, de sorte que la présence de l'acide domoïque, conjuguée à la présence d'une ischémie, pourrait avoir aggravé le sort des personnes en mauvaise santé.

Question provenant de la salle : Je n'aime pas montrer mon ignorance en chimie, mais est-ce que les isomères de l'acide domoïque sont présents dans les mêmes proportions dans toutes les sources, y compris dans l'acide domoïque synthétique que nous avons?

J. Wright : Non, il semble que la proportion varie selon la source d'acide domoïque ou, du moins, de la matrice dans laquelle se trouve l'acide domoïque. J'ai montré une diapositive sur laquelle on peut voir des traces de l'isomère dans du phytoplancton cultivé en laboratoire. On en voit un peu plus dans le phytoplancton capturé dans la baie Cardigan et on en voit encore plus dans les tissus des moules, qu'elles soient cuites ou non. Nous avons maintenant appris à synthétiser ces isomères en laboratoire, parce que nous nous sommes lassés de faire l'extraction de grande quantité de moules pour essayer d'obtenir quelques microgrammes d'isomères, et nous avons maintenant une bonne idée de la façon dont ils sont synthétisés dans la nature; et ce n'est pas un procédé déraisonnable que d'imaginer comment ils pourraient être fabriqués dans la nature à partir de l'acide domoïque.

Question provenant de la salle : S'il s'agit d'une toxicité qui se manifeste par l'intermédiaire de récepteurs, et comme nous le pensons, de récepteurs d'acides aminés excitateurs, cette question est d'une importance primordiale parce qu'elle pourrait expliquer les différences dans les valeurs mesurées de la puissance ou de l'activité. Lorsque le profil des isomères est différent, nous travaillons avec des quantités différentes d'ingrédient actif.

J. Wright : Oui, c'est vrai. Nous nous sommes évidemment beaucoup intéressés à cette question et nous sommes même allés plus loin, car nous nous sommes demandé si les isomères pourraient être encore plus toxiques que l'acide domoïque lui-même. Les travaux de John McDonald, de même que ceux de David Hansen dont je n'ai pas fait mention mais qui, incidemment, aboutissent aux mêmes constatations que ceux de McDonald, donnent à entendre

que les isomères géométriques, du moins, sont beaucoup moins toxiques que l'acide domoïque lui-même. Mais j'aimerais répéter, encore une fois, que nous parlons ici de différences très légères et que les profils des isomères du plancton et des moules sont comparables. Même dans le pire des cas, lorsque les isomères sont le plus visibles, ils représentent encore moins de 10 % de la quantité totale d'acide domoïque dans l'extrait de coquillage, et c'est le pire des cas possibles. Le plus souvent, ces isomères comptent pour 1 à 5 % du total.

Question provenant de la salle : J'aimerais souligner un autre point. Comment expliquez-vous le délai entre l'ingestion des moules toxiques et l'apparition des symptômes, surtout des symptômes neurologiques, si on le compare à ce qui se passe dans les expériences effectuées chez les rongeurs et les primates?

I. Hynie : Je crois qu'en ce qui concerne le délai entre l'ingestion et l'apparition des symptômes gastro-intestinaux, c'est une question qui sera traitée demain et qui a été traitée dans une certaine mesure aujourd'hui : il semble qu'en fait, les symptômes gastro-intestinaux ne sont pas directement causés par l'acide domoïque localement, mais qu'ils sont induits par l'intermédiaire du système nerveux central. Le délai pourrait être attribuable au fait que le poison traverse lentement la barrière hémato-encéphalique, de sorte qu'il faut un certain temps avant que la concentration d'acide domoïque dans le cerveau soit suffisante pour devenir efficace. De toute évidence, chez les rongeurs, ce passage serait beaucoup plus rapide que chez l'être humain. Mais nous en savons encore très peu sur ces processus, parce que nous ne savons à peu près rien du métabolisme de l'acide domoïque chez les animaux, y compris les humains, et qu'on n'en sait guère plus sur son transport à travers la barrière hémato-encéphalique.

Question provenant de la salle : Il est certain que le nombre de personnes qui ont consommé des moules est beaucoup plus grand que le nombre de personnes qui ont été malades. Pouvez-vous expliquer cette situation?

I. Hynie : Je crois que nous avons déjà parlé ici de cette question. En gros, on peut dire que pour une personne malade, 500 ont consommé des moules. Cette situation s'expliquerait probablement par une combinaison de trois facteurs. Premièrement la dose, deuxièmement l'état de santé de la personne, y compris son âge, et troisièmement, une prédisposition génétique. On pourrait ajouter d'autres facteurs au sujet desquels on ne sait vraiment pas grand-chose, comme par exemple ce qui a été consommé en même temps que l'acide domoïque ou ce qui a été consommé avant. Par exemple, un repas à forte teneur en protéines, un apport élevé en glutamate peuvent augmenter ou diminuer vos chances d'être malade. Mais la seule donnée vraiment solide dont nous disposions, c'est que la plupart des personnes qui sont tombées gravement malades étaient des personnes dont la santé était déjà minée par une autre maladie, comme une néphropathie, une insuffisance hépatique, une insuffisance cardiaque, l'athérosclérose, le diabète. Il est vrai également que certaines personnes sont tombées malades alors qu'elles étaient auparavant en bonne santé. Alors, encore une fois, il n'y a rien d'absolu. S'il n'y a pas d'autres questions, j'aimerais remercier les membres du groupe d'experts et demander au D[r] Perl de prendre la relève pour la prochaine discussion.

11. Discussion du groupe d'experts : définition du syndrome

T.M. Perl, J. Teitelbaum, J. Hockin et E.C.D. Todd.

T. Perl : On nous a demandé de définir le syndrome et j'ai pensé que cette question comporte plusieurs aspects. Un de ces aspects concerne la définition clinique et l'autre les aspects biologiques de la définition. J'ai donc pris comme point de départ de nos discussions la définition épidémiologique que nous avons utilisée et je sais qu'elle posera certaines difficultés. Par exemple, il est probable que nous ne voudrions pas inclure l'expression «moule de l'Île-du-Prince-Édouard» dans cette définition et j'ai pensé que nous pourrions commencer ici. Certains des biologistes et peut-être certains des cliniciens ici présents, probablement juste Jeannie Teitelbaum et moi-même, voudront débuter par les aspects gastro-intestinaux. Je sais que du point de vue épidémiologique, nous avons vu une grande variété de manifestations gastro-intestinales, qu'elles étaient non spécifiques et qu'il serait probablement difficile de les utiliser comme descripteurs du syndrome. Toutefois, un élément qui pourrait faire partie du syndrome serait la durée de ces symptômes.

Bien que l'information que nous avons ne soit pas excellente, nous avons certaines données qui laissent entendre que ces symptômes ont persisté non pas un ou deux jours seulement, mais parfois jusqu'à une semaine. Quelqu'un a-t-il quelque chose à dire à ce sujet?

J. Teitelbaum : Je ne suis pas sûre de savoir ce que vous entendez par durée - celle des symptômes aigus et seulement des symptômes gastro-intestinaux?

T. Perl : Bon, entre l'apparition des symptômes et leur disparition, le malade peut avoir des nausées et des vomissements et ces symptômes peuvent persister pendant une semaine ou dix jours.

J. Teitelbaum : Je n'ai vu qu'un petit groupe de malades et il s'agissait des plus malades; mais les vomissements qui ont débuté d'une à 24 h après la consommation n'ont pas duré pendant plus de 72 h chez aucun des 14 malades de ce groupe. L'hémorragie gastro-intestinale qui a été observée est parfois apparue beaucoup, beaucoup plus tard et on pensait à ce moment-là qu'elle n'était pas reliée à l'acide domoïque lui-même, ce qui pourrait être une erreur si l'on en juge d'après les études expérimentales. Si l'on réexamine la question, on s'aperçoit que deux personnes ont effectivement subi une hémorragie gastro-intestinale dans cette période de 24 h; et chez une autre personne, l'hémorragie s'est fait attendre trois mois. Cet élément pourrait faire partie du syndrome s'il y a ulcération du tractus gastro-intestinal causée par l'acide domoïque. Il peut ne pas y avoir d'hémorragie clinique avant un long moment si l'hémorragie est infraclinique. Je ne crois pas que nous ayons recherché le sang occulte chez ces malades, du moins chez ceux qui ont été hospitalisés chez nous.

T. Perl : Il y a-t-il quelqu'un de Winnipeg, du groupe du Dr Pinsky, qui pourrait nous dire dans quelle mesure ces constatations étaient caractéristiques? Je sais que vous vous étendrez longuement sur la question demain, mais en général, pensez-vous qu'elles sont assez caractéristiques pour faire partie de la définition?

G. Galvin : Oui. Je peux commenter les faits mentionnés par le Dr Teitelbaum. L'autopsie a révélé chez un de nos patients une lésion duodénale, une lésion duodénale qui était presque perforante. Demain je vous dirai que l'extrait de moule entière tout comme l'acide domoïque pur produit des lésions duodénales très distinctes chez les rats, ce qui est très difficile à obtenir. Tous ceux qui font de la recherche sur le tractus gastro-intestinal savent combien il est difficile de provoquer une lésion duodénale chez un rat, que ce soit avec des doses très peu physiologiques de nicotine et de propionitrol et toute sorte de produits inimaginables. Dans ce cas-ci, nous avons des doses très faibles et des quantités très modestes. Je dirais donc que la pathologie duodénale est très, très typique et que la rapidité avec laquelle on observe l'hyperémie et l'hémorragie gastro-intestinales chez la souris, en l'espace de 15 à 20 minutes, est également une situation atypique et difficile à obtenir autrement. Par conséquent, je crois que ces faits militent en faveur de l'inclusion de ces symptômes. Par contre, le nombre de malades qui, d'après vos critères, ont eu le syndrome toxique sans toutefois éprouver de troubles gastro-intestinaux apparents constitue un argument contraire, et c'est un mystère.

T. Perl : Bien, nous n'y sommes pas allés voir. Cela fait partie du problème!

Question provenant de la salle : Vous avez fait état d'hypersécrétion bronchique, d'œdème pulmonaire. Est-ce que ces symptômes sont plus caractéristiques que les vomissements et la diarrhée eux-mêmes? C'est là un effet vraiment courant connu de tous ceux qui ont travaillé sur les lésions provoquées par l'acide kaïnique chez des animaux; vous perdez un certain nombre d'animaux à cause de cela.

J. Teitelbaum : Si l'on regarde les 14 sujets qui ont été les plus gravement malades, au moins 50 % ont manifesté un hypersécrétion bronchique qui nous a amenés à rechercher la présence d'organophosphates. En fait, j'ignore si cette constatation est plus importante que la nausée et les vomissements qui ont touché pratiquement tout le monde, sauf peut-être une ou deux personnes. Peut-être s'agit-il d'une manifestation qui est proportionnelle à la gravité de l'intoxication.

Question provenant de la salle : Et les perturbations autonomiques?

J. Teitelbaum : Nous pensons vraiment qu'il y a eu des lésions des cellules du système nerveux autonome: le fait que les malades ont manifesté de la bradyarythmie et de la tachyarythmie, de l'hypotension et de l'hypertension ainsi que de l'hypersécrétion bronchique pointent dans cette direction. Toutefois, nous n'en avons pas fait la preuve. Ce que nous pourrions faire, à moins que quelqu'un ait autre chose à dire sur les symptômes gastro-intestinaux, c'est nous arrêter aux symptômes neurologiques, et ensuite nous discuterons des autres symptômes qui comprennent les symptômes cardio-vasculaires et autonomiques, etc.

I. Hynie : Je me demande seulement si, à part une définition générale du syndrome, nous n'aurions pas aussi besoin d'une description plus détaillée qui pourrait être utile pour le diagnostic des cas sporadiques. Une épidémie comme celle de 1987 n'aura probablement jamais plus lieu, mais la possibilité de cas isolés existe. Les symptômes les plus communs, comme ceux de l'appareil gastro-intestinal, pèchent par leur manque de spécificité et ne seraient pas très utiles dans un cas isolé. Les symptômes comme l'hypersécrétion bronchique, les irrégularités de la tension artérielle et tous les symptômes neurologiques sont peut-être moins fréquents, mais ils sont plus spécifiques. J'estime également que le diagnostic d'un cas isolé devra être confirmé par un test de laboratoire, préférablement un dosage dans les selles ou l'urine. Peut-être trouveriez-vous plus profitable d'esquisser aujourd'hui une description générale du syndrome, quitte à rechercher un consensus sur la définition, en petit comité groupé, plus tard?

J. Hockin : Pour répondre à cette question, je vais vous dire à quelle enseigne je loge. Je ferais un parallèle entre ce syndrome et l'intoxication paralysante par les mollusques qui est nettement une maladie gastro-intestinale, qu'elle soit à médiation centrale ou locale, mais qui a d'autres manifestations chez certaines personnes. Ce sont ces autres manifestations qui définissent le syndrome comme étant une intoxication par l'acide domoïque, et non par quelque chose d'autre. Dans les cas isolés où la maladie est bénigne, je pense qu'il est très important, à cause de la possibilité d'une maladie beaucoup plus grave, de reconnaître la maladie gastro-intestinale comme pouvant être causée par l'acide domoïque, et je crois que la meilleure façon de le faire, c'est de prélever un échantillon non clinique, comme des moules, pour lequel les méthodes d'analyse sont très bien définies. J'estime que les moules ou les mollusques d'autres espèces sont les échantillons de premier choix pour essayer d'établir un diagnostic clinique. Je ne dis pas qu'il faille s'abstenir de mettre au point un test qui pourrait se révéler important pour le diagnostic rapide d'un cas de maladie grave. J'aimerais mettre l'accent sur la surveillance et reconnaissance à un stade précoce des cas bénins, plutôt que des seuls cas très graves.

Question provenant de la salle : Vous avez fait allusion à d'autres mollusques. Quelqu'un a-t-il observé chez d'autres mollusques bivalves, comme les huîtres, les palourdes, etc., des concentrations tissulaires d'acide domoïque supérieures à 20 µg par gramme?

J. Wright : Oui, il y a eu un assez grand nombre d'échantillons prélevés dans le temps et il y a aussi un relevé effectué par Pêches et Océans Canada, parfois en collaboration avec nous. Corrigez-moi si je me trompe, mais que je sache, le seul autre coquillage chez lequel on ait trouvé des concentrations d'acide domoïque, et à des concentrations supérieures à 20, sont les pétoncles; cet acide était présent uniquement dans la glande digestive et comme cette dernière n'est pas consommée dans les pétoncles, il n'y aurait pas de problème, d'après ce que je peux voir.

Commentaire provenant de la salle : Un simple commentaire. Nous l'avons trouvé à des concentrations supérieures chez des myes et chez la moule géante et il semblerait que l'acide domoïque soit présent, d'une manière assez usuelle, chez les filtreurs qui vivent le long de la côte. Les pétoncles, du moins, vivent en eau profonde. Pour une raison ou pour une autre, nous n'avons pas trouvé d'acide domoïque chez certaines des autres palourdes américaines qui vivent en eau profonde.

C. Pinsky : J'aimerais demander aux D[rs] Teitelbaum et Perl si l'on a procédé à des EEG tôt au cours de l'évolution du syndrome chez certains des malades. De plus, y a-t-il un test rapide pour déceler les déficits visuo-spatiaux et ces derniers sont-ils apparus tôt dans l'évolution du syndrome.

J. Teitelbaum : L'EEG a été effectué tôt, dès 48 h après l'ingestion, chez environ trois des malades – dont deux à l'hôpital Royal Victoria. L'EEG a révélé à cette occasion une perturbation généralisée et grave de l'activité; on a observé des ondes lentes partout; il semblait que la perturbation était plus prononcée dans l'hémisphère gauche, mais elle n'était pas strictement localisée. Moins de 24 h plus tard, un malade a présenté une activité épileptiforme généralisée provenant par moments du lobe temporal gauche; parfois, c'était des crises motrices focales dans l'hémisphère gauche; les autres fois, l'activité était généralisée.

J. Teitelbaum : Les troubles digestifs ont commencé avant qu'on pratique les EEG et ils avaient presque complètement disparu au moment où l'on a effectué les EEG, c.-à-d. seulement après le début de l'état confusionnel environ 24 h plus tard. L'évaluation de l'aptitude visuo-spatiale n'a été réalisée formellement pour la première fois qu'environ quatre mois plus tard, sauf pour un cas à l'hôpital Notre-Dame, où elle aurait été effectuée un peu plus tôt.

T. Perl : Je m'interroge sur l'utilité de procéder à une évaluation de la coordination visuo-spatiale chez une personne gravement malade. Je ne sais pas si le test serait très sensible et cela peut, tout simplement, ne pas être pratique.

Question provenant de la salle : Ce matin, dans votre exposé, vous avez proposé de baptiser cette symptomatologie du nom d'«intoxication amnésiante par les coquillages» et cet après-midi, nous venons juste d'entendre le D[r] Hockin en parler comme d'un syndrome gastro-intestinal. Je me demande s'il serait possible de mieux cerner l'objet de nos discussions. Il semble y avoir une assez grande divergence entre les deux noms proposés pour ce syndrome.

D[r] Hockin : Je pourrais aussi être responsable du terme «intoxication amnésiante par les coquillages». J'ai aussi appelé l'intoxication paralysante par les coquillages un syndrome gastro-intestinal. La raison pour laquelle j'ai employé l'expression intoxication amnésiante par les coquillages, c'est que l'amnésie semble être l'effet neurologique prédominant, de la même manière que l'effet paralysant caractérise l'intoxication paralysante par les coquillages. L'expression «intoxication amnésiante par les coquillages» semblait s'appliquer, à l'encontre de certaines des autres expressions possibles. Je pense, à la lumière de l'exposé du D[r] Teitelbaum, que le sens du mot «amnésiant» est assez large, mais qu'il semble bien s'appliquer à la perte permanente qu'éprouvent certaines personnes.

R. Auer : J'aimerais savoir, du point de vue clinique, quel a été le chiffre minimal de la tension artérielle chez les

malades qui n'avaient pas une cardiopathie athérogène.

J. Teitelbaum : Les trois malades qui ont été les plus gravement atteints et qui sont entrés en état de choc avaient des tensions systoliques autour de 90 et une valeur imperceptible pour la diastolique. Chez un malade, il y avait une cardiopathie athéroscléreuse, mais cette affection ne semblait pas expliquer le problème. Ces malades étaient hospitalisés aux soins intensifs où on leur avait introduit des cathéters de Swan-Ganz. Ils auraient eu une vasodilatation massive soudaine et inexpliquée. On leur a administré des quantités phénoménales de solutés qui ont corrigé la tension artérielle; cette vasodilatation, cette baisse de la résistance s'est corrigée d'elle-même, sans traitement. Les sujets ont par la suite fait de l'oedème pulmonaire et nous avons dû les débarrasser des liquides que nous leur avions administrés. La seule explication que nous avons pu trouver, c'était que la vasodilatation était d'origine autonomique, vu qu'il n'existait pas de problème cardiogène à ce moment-là chez la plupart des patients.

R. Auer : Je suppose que demain, le Dr Carpenter nous indiquera s'il y avait des lésions parasagittales évocatrices d'une ischémie, mais je suis également sceptique quant au synergisme proposé entre l'ischémie et les lésions excitotoxiques. Certes, on ne trouve pas d'exemples de cette situation dans les expériences publiées. Si on abaisse la pression artérielle dans diverses situations d'excitotoxicité, on ne fait que mettre un terme à l'épilepsie, mais l'on n'exacerbe pas les lésions du cerveau.

J. Teitelbaum : On ne sait même pas avec certitude si ces lésions seraient situées aux mêmes endroits dans le cas d'une ischémie et dans le cas de l'intoxication par l'acide domoïque, mais nous aimerions pouvoir démontrer que chez nos malades, le dommage n'était pas lié à l'ischémie, mais plutôt à l'acide domoïque et c'est probablement ce qui sera dit demain.

Question provenant de la salle : J'aimerais demander à ceux qui ont participé à l'autopsie des malades s'ils ont examiné les rétines et les bandelettes optiques?

T. Perl : À ma connaissance non. Puis-je vous demander pourquoi vous le demandez?

Réponse provenant de la salle : On sait que chez une grande variété d'animaux, certaines couches cellulaires de la rétine possèdent une concentration très élevée de récepteurs de l'acide kaïnique et je me demandais si l'on avait observé des lésions quelconques chez les malades qui sont décédés.

T. Perl : Lorsque vous observez les animaux, pouvez-vous observer ce phénomène à l'oeil nu ou s'agit-il seulement d'un diagnostic établi au microscope?

Réponse provenant de la salle : Oui, cela a été démontré par autoradiographie des récepteurs.

Question provenant de la salle : Dans la présentation faite ce matin par le Dr Teitelbaum, elle a souligné que tous les malades – cinq sur cinq – qui ont eu des convulsions avaient une résistance à l'égard du Dilantin®. Avez-vous de l'information à ce sujet dans le cas des autres malades?

T. Perl : Le reste des malades qui ont eu des crises et qui étaient à l'extérieur de Montréal? Je pense à deux cas en particulier, et nous n'avons pas d'information détaillée sur la façon dont ils ont été traités, mais les deux sont décédés. L'un d'eux est décédé moins de 24 h après le début des convulsions; l'essai thérapeutique chez lui n'a pas dû être concluant; quant à l'autre, je n'ai pas d'information.

L. Tryphonas : J'aimerais faire deux observations. Une en réponse à la question de l'intervenant précédent. Chez les animaux d'expériences, on a observé des lésions de la rétine tant chez les primates non humains que chez les rongeurs; et ces lésions sont observées de manière constante et sont du même type. L'autre observation que j'aimerais faire, c'est que si nous devons nommer ce syndrome au cours du présent symposium, que nous attendions une journée de plus jusqu'à ce que nous ayons en main toutes les données anatomo-pathologiques, cela pourrait être utile.

T. Perl : J'ai toujours l'impression que nous n'avons pas beaucoup progressé dans la définition du syndrome. Je sais qu'il y a dans l'assistance une personne qui a été mêlée de près à cette épidémie dans la région de Montréal et qui pourrait avoir certains commentaires sur la meilleure façon d'aborder la définition de cas pour qu'on puisse l'appliquer à la surveillance en pratique; je parle de Tom Kasatsky. Pour ce qui est des symptômes neurologiques, je ne sais pas si quelqu'un d'autre a des observations, mais la triade que nous avons utilisée est relativement spécifique et discriminante; en vérité, elle nous a été très utile lorsque nous étions en présence de symptômes neurologiques. Lorsque nous avons éprouvé des difficultés, c'était avec les personnes qui présentaient des symptômes neurologiques légers. Un de ces symptômes, à savoir les étourdissements, a été abondamment débattu et nous avons décidé que, probablement, il n'était pas nécessairement une manifestation de maladie neurologique. Ce symptôme pourrait être l'expression d'une hypovolémie ou de bien d'autres choses. Il est assez peu spécifique pour n'être pas utile. Un autre symptôme dont nous avons discuté est la perte d'équilibre et encore une fois, nous avons trouvé que pour reconnaître la maladie, ce symptôme n'est pas non plus très utile, à moins que l'on ait démontré par un examen neurologique qu'il s'agit d'une ataxie vraie; l'expression «perte d'équilibre» signifie trop de choses différentes selon les personnes. Ainsi, outre la triade, les autres données utiles que nous avons été en mesure de recueillir sont les autres signes objectifs. Nous avons donc cherché les altérations de la conscience, les convulsions et les paralysies des nerfs crâniens. Je me demande si les gens qui sont ici pensent qu'il pourrait s'agir là d'une partie raisonnable de la définition, s'ils connaissent une meilleure façon d'aborder la question. Faudrait-il ajouter encore d'autres choses?

J. Teitelbaum : Je suis d'accord pour dire que la perte d'équilibre et les étourdissements sont des symptômes que l'on ne peut absolument pas inclure dans la définition, car tout le monde a une définition différente de ces deux termes. Chaque malade a sa propre définition. La perte de mémoire est un élément difficile à inclure dans la définition d'un cas aigu, parce que nous n'avons pas constaté ce symptôme au cours de la phase aiguë de la maladie. Elle ne peut être démontrée que lorsque le malade est suffisamment éveillé pour se prêter au test qui permet de l'établir; c'est pourquoi je ne pense pas que l'on puisse

inclure ce symptôme dans n'importe quelle définition de la maladie au stade aigu. Ce qui était typique, c'était la confusion et la désorientation, étant donné que ces deux symptômes vont de pair - les malades qui sont confus sont presque toujours désorientés et présentent des modifications de leur niveau de conscience. Ces éléments sont constants et je crois qu'ils sont les plus importants. Comme ces malades sont devenus encéphalopathiques, peut-être le nom du syndrome devrait-il être «encéphalopathie liée aux coquillages», bien que cette expression soit beaucoup plus vaste. C'est seulement lorsque les malades sont éveillés que vous pouvez dire qu'ils ont eu une perte de mémoire constituant une véritable amnésie.

T. Perl : Qu'advient-il de l'inclusion d'autres critères neurologiques objectifs?

Question provenant de la salle : Au sujet de la perte de coordination et des anomalies motrices, dois-je présumer qu'il n'y avait pas d'anomalies motrices constantes chez les malades? Parce que chez les rongeurs, et surtout chez la souris, la situation est très claire. Les mouvements, surtout les mouvements vers l'avant, et les mouvements de mastication et autres sont toujours présents et se manifestent toujours exactement au même endroit dans la séquence des symptômes. N'était-ce pas la même chose chez les humains?

J. Teitelbaum : Oh oui, j'ai placé ces manifestations parmi les convulsions parce que, comme je l'ai indiqué, c'était bien des convulsions et des mouvements anormaux, car cela comprend les postures anormales, la mastication, les myoclonies et les crises convulsives. Ces manifestations n'étaient pas toutes présentes chez tous les malades. Ceux qui ont eu des convulsions ont eu tendance à présenter toutes ces manifestations, mais ce ne sont pas tous les patients qui ont présenté des convulsions, seulement cinq de nos 14 malades et, de fait, il s'agissait des plus gravement malades.

Commentaire provenant de la salle : Peut-être que la difficulté que nous éprouvons avec ce syndrome vient du fait qu'il existe une séquence d'événements dans l'évolution du syndrome complet, comme nous l'avons observé chez les animaux. Quelques-uns ne se rendent pas au bout de la séquence, mais peuvent s'arrêter à n'importe quel point. Il faudrait donc en tenir compte.

T. Perl : Je pense que Jamie Hockin a très bien exprimé l'idée que la maladie a des manifestations très variées, comme vous venez de le laisser entendre. Les manifestations que nous observons sont, dans une proportion allant jusqu'à 98 %, de nature digestive et dans le petit nombre de cas où nous n'avons pas observé ces manifestations, nous ne sommes pas certains qu'elles n'ont pas existé. Nous n'avons tout simplement pas les renseignements. Il y a aussi, comme vous l'avez dit, un certain sous-groupe de malades qui, eux, auront les manifestations neurologiques.

Commentaire provenant de la salle : Nous avons fait une analyse rétrospective, au moyen d'un questionnaire, des cas d'environ 100 personnes qui répondaient à la définition de cas d'abord adoptée, constituant déjà un sous-ensemble du groupe total. Nous leur avons demandé environ deux mois plus tard de parler de leur maladie; environ 95 % ont affirmé avoir éprouvé des vomissements aigus après la consommation des moules et, de ce même groupe, environ 40 % ont fait état d'une profonde faiblesse musculaire et d'une diminution de l'usage de la parole, un manque de volubilité. De la façon dont ils ont décrit la chose, ce n'était pas tant l'incapacité à exprimer des idées qui était le problème, mais l'absence du désir de parler ou l'incapacité de produire un discours normal. Ils parlaient tout simplement moins. Parmi les cas hospitalisés, avez-vous observé la même chose? Est-ce que cet élément serait utile dans la définition pour ce qui est de l'état neurologique, surtout dans le cas des personnes qui éprouvent les formes les plus bénignes de la maladie, par opposition, par exemple, à la perte de mémoire aiguë que nous avons également constatée chez environ 25 % des cas, proportion tellement plus faible que pour les deux autres symptômes?

J. Teitelbaum : En ce qui concerne l'absence de discours, il était difficile de définir ce qui se passait et de nombreux dossiers médicaux en font état : on parle d'aphasie, d'aphasie expressive, ce qui serait une absence d'expression. Certains des malades semblaient muets, mais ils ne répondaient pas plus à la douleur qu'ils ne répondaient aux paroles, c'est pourquoi il est très difficile d'établir cet élément comme un fait absolu, lorsqu'on veut parler d'un examen neurologique objectif. Je suis cependant d'accord avec vous pour dire que nous avons effectivement noté que ces malades n'avaient pas le goût de parler; littéralement, il semblait y avoir chez eux une absence de volonté de parler ou d'initiative dans ce sens. Je ne suis pas surprise que cette question ait refait surface deux mois plus tard. Si je devais inclure cet élément dans la définition, je le mettrais dans la description du syndrome, mais je ne sais pas si on peut l'utiliser comme un critère probant. De nombreux malades ont dit qu'ils étaient faibles. C'est un état qui accompagne les étourdissements, je veux dire une faiblesse générale. Vous avez des malades qui ont des nausées, des vomissements prolongés pour toutes sortes de raisons et qui vous diront simplement qu'ils se sentent très faibles; c'est le genre de symptôme que l'on voit fréquemment en neurologie, mais que l'on ne peut utiliser à moins qu'il ne soit corroboré par autre chose. Quand un de nos malades nous dit «je sens une faiblesse générale», on en prend note, mais à moins qu'il y ait une atrophie musculaire ou des signes objectifs de faiblesse décelés à l'examen, une perte de réflexe ou quelque chose à l'EMG, nous ne pouvons nous en servir comme d'un fait objectif.

Commentaire provenant de la salle : Pour ce que ça vaut, les malades disent souvent que la faiblesse a commencé à peu près au même moment que les vomissements; ainsi, si jamais la faiblesse avait une signification, elle serait la première indication d'une atteinte neurologique.

J. Teitelbaum : Personnellement, je n'incluerais pas cet élément dans la définition, mais il est certain que je garderais à l'esprit, dans la description d'un cas, que le malade se plaint de faiblesse, quoi que cela puisse représenter.

T. Perl : Comme la plupart d'entre vous pouvez le voir, il sera très difficile de placer les manifestations cliniques dans une définition et je me demandais si quelqu'un voudrait parler des aspects liés au diagnostic en laboratoire, à savoir si la meilleure approche serait de tenter de reconnaître le toxique dans les aliments, ce qui est souvent difficile à faire dans le

cas des restaurants parce qu'il est rarement possible de récupérer les aliments après le coup, une fois que la personne est malade, ou encore, de recourir aux tests qui ont maintenant été étudiés chez des modèles animaux, aussi bien les analyses de selles que d'urine?

F. Iverson : Nous avons utilisé certains des tests qui nous étaient accessibles. Je pense que Jim Lawrence a souligné que le dosage habituel par CLHR est très efficace dans le cas des selles, il fonctionne tout aussi bien que lorsque vous l'utilisez sur des extraits de moules toxiques. Il a également indiqué, et nous en arrivons à la même conclusion, qu'il est beaucoup plus difficile de le faire avec l'urine. Faire ce test avec autre chose que les selles et l'urine est très, très difficile; nous avons été incapables de le faire avec divers autres substrats, comme le sang, du moins à des concentrations inférieures à une partie par million.

T. Perl : Nous verrons souvent ces malades 24, 48, 72 h et même plus après l'ingestion. Quelle sera la sensibilité et la spécificité de ce test à ce moment-là, si l'on suppose qu'il y aura encore un délai entre le moment où le malade consultera un médecin et le moment où ce dernier pensera à ce diagnostic?

F. Iverson : Je pense qu'on pourrait prélever un échantillon de selles, ce qui est certainement la meilleure chose à faire. Je n'arrive pas à penser à une autre solution.

C. Pinsky : Pourquoi pas l'imagerie par résonance magnétique? Elle devrait révéler la présence de cellules gonflées d'eau dans l'hippocampe, surtout dans l'aire CA-3, s'il y a eu à cet endroit de l'acide domoïque en quantité suffisante.

J. Teitelbaum : Cette question sera probablement traitée de manière plus approfondie demain lorsqu'il sera question d'IRM et de TP. Mais l'IRM ne se sont pas révélées très utiles dans le cas des quatre patients chez qui on les a effectuées. Un des malades est devenu positif à une date ultérieure, lorsque les manifestations au niveau des deux hippocampes étaient devenues plus importantes, mais c'était un an plus tard. Il n'y avait rien d'anormal trois mois après l'accident lorsque le test a été effectué pour la première fois et, chez les autres patients, les résultats étaient normaux malgré la présence d'anomalies cliniques certaines.

T. Perl : Il semble que nous sommes d'accord qu'on devrait utiliser pour l'instant l'analyse des selles et, si on peut mettre la main sur les moules, qu'on les utilise aussi. J'ai une autre question pour M^me^ Teitelbaum. Le D^r^ Pinsky y a fait allusion. Y a-t-il des épreuves de laboratoire courantes en milieu clinique que vous ayez trouvées d'une certaine utilité, quelque chose qui serait au moins pertinent à la maladie?

J. Teitelbaum : La réponse est non. La fonction rénale est anormale, mais cette situation peut être attribuable à une multitude de causes, et il s'agit d'une manifestation non spécifique; la tomographie informatisée n'a pas été utile, non plus que l'IRM; peut-être que la TP pourrait être utile, mais il s'agit d'un examen assez difficile à mettre en oeuvre, surtout chez quelqu'un qui est dans un état critique et qui est hospitalisé aux soins intensifs. L'EEG est anormal, mais non spécifique. Rien dans le tracé ne nous indique qu'il s'agit d'une intoxication par l'acide domoïque. Quant aux modifications de l'EMG, tout cela est bien joli, sauf que nous savons tous que les malades dont l'état est critique peuvent présenter des neuropathies qui sont tout simplement attribuables à leur état critique et à des anomalies électrolytiques. Ainsi, je crois qu'il n'y a rien parmi ces techniques qui soit suffisamment spécifique pour nous être utile.

T. Perl : Quelqu'un a-t-il des choses à ajouter?

Question provenant de la salle : Est-ce que les nausées et les vomissements pouvaient être traités par la phénothiazine? Avez-vous essayé de traiter ces symptômes?

J. Teitelbaum : J'avais un petit groupe de malades. Lorsqu'ils se sont présentés, ces symptômes ne constituaient pas le problème principal et ils ont disparu d'eux-mêmes. Lorsqu'il y a eu traitement, on a utilisé du Gravol (dimenhydrinate) par voie intraveineuse, mais je ne sais pas si ce traitement a eu quelque chose à voir avec la disparition des symptômes.

T. Perl : La seule personne qui pourrait avoir la réponse est Tom Kasatsky qui a recueilli cette information au cours de la post-cure, mais j'ignore si l'analyse de cette information est terminée. Non.

La dernière observation que j'aimerais faire sur cette question, c'est que nous avons fixé des limites de temps arbitraires pour l'apparition de la maladie. Bien que près de 90 % des cas de maladie soient survenus dans ces limites, il y a probablement un certain pourcentage de malades qui nous ont échappé; ces limites pourraient ne pas être réalistes. Nous avons une étendue, une moyenne et une médiane pour l'apparition de ces symptômes, mais la fixation d'une limite peut signifier qu'un certain pourcentage de ces symptômes sont passés inaperçus, et il est possible que ce ne soit pas une chose utile pour la définition.

Commentaire provenant de la salle : J'aimerais juste faire un bref commentaire sur cette question. J'inclinerais dans le même sens, simplement parce que d'après ce que nous avons entendu ici et d'après ce que nous avons vu dans divers travaux de laboratoire, il semble qu'il y ait une variation considérable de la biodisponibilité *per os* de ce composé. Étant donné la forte vraisemblabilité qu'il y ait quelque chose de particulier chez les personnes qui ont été malades, que ce soit dans la cinétique d'absorption ou ailleurs, le fait d'avoir une définition très rigoureuse de cette cinétique pourrait avoir pour effet, comme vous l'avez dit, d'augmenter les risques de passer à côté de certains cas. Je crois qu'il y a de bonnes chances que certaines personnes mettent plus de temps que d'autres à absorber le produit et, par voie de conséquence, à présenter les symptômes.

T. Perl : D^r^ Hynie, j'ignore si cette suggestion vous plaira. Je pense, comme vous, que ce serait une bonne idée qu'un groupe de personnes propose une définition que l'on pourra ensuite examiner, mais je ne sais pas si c'est ce forum qui s'y prêtera le mieux. Avez-vous des propositions à faire?

I. Hynie : Je ne veux pas en faire maintenant, mais peut-être pourrions-nous en discuter de manière informelle tout à l'heure et arriver demain avec des propositions utiles, parce que, comme vous le savez, c'est demain qu'un groupe d'experts traitera de la nécessité de faire des recherches à court terme et, peut-être, serait-ce là un des sujets qui pourraient être abordés.

T. Perl : C'est une excellente idée.

ADDENDA

Après le symposium, nous avons reçu les propositions suivantes pour le nom et la description du syndrome :

1. Proposition de J. Hockin et T. Perl.

   Nom du syndrome : «Intoxication amnésiante par les mollusques»

   Description du syndrome :

   - intoxication aiguë causée par l'ingestion de coquillages (mollusques) contenant de l'acide domoïque
   - les symptômes gastro-intestinaux sont universels avec l'apparition, dans un délai allant de quelques heures à une journée, de l'un ou plusieurs des symptômes suivants : nausées, vomissements, anorexie, crampes abdominales, diarrhée
   - certains malades ont des maux de tête graves et persistants ou des troubles à court terme de l'équilibre ou de la vue
   - dans les cas les plus graves, un état confusionnel aigu survient dans un délai allant de quelques heures à trois jours après l'ingestion; parmi les signes prédominants figurent l'un ou plusieurs des signes suivants :
     - désorientation, confusion, diminution de l'usage de la parole pendant une période allant jusqu'à deux semaines
     - dysfonctionnement du système nerveux autonome pouvant durer plusieurs jours à quelques semaines (arythmie, fluctuations de la tension artérielle, hoquet, hypersécrétion bronchique nécessitant une intubation, sueurs, fébricule)
     - convulsions, mouvements oculaires anormaux, grimaces, attitudes anormales, myoclonies, perte de réflexes
   - la mort peut survenir
   - les séquelles tardives prédominantes semblent se limiter à la perte de l'aptitude visuo-spatiale intermédiaire et à des mononeuropathies
   - constatations de laboratoire en phase aiguë non spécifiques, bien qu'il y ait leucocytose, des anomalies non spécifiques de l'EEG et une augmentation de la CPK; constatations anormales par IRM, TP et EMG après 2-3 mois
   - l'acide domoïque peut être décelable dans des extraits acides chauds de selles au cours des premiers jours suivant la consommation.

2. Proposition de C. Pinsky, R. Bose et G. Galvin

   Nom du syndrome : «Syndrome toxique neuro-viscéral»

   Description du syndrome :

   «Syndrome observé pour la première fois après l'ingestion de moules contaminées par l'acide domoïque cultivées dans des eaux où la concentration de *Nitzschia pungens* est élevée. Il est caractérisé par plusieurs des symptômes aigus suivants (par ordre chronologique approximatif d'apparition) : nausées, vomissements, gastralgie neurogène, hémorragie gastrique, diarrhée, étourdissements, confusion, faiblesse, léthargie, somnolence, céphalées, coma et convulsions. Il peut également y avoir un signe chronique, à savoir une perte grave de la mémoire à court terme, sans démence, qui se rétablit très légèrement et très lentement avec le temps».

12. L'excitotoxicité : Vue d'ensemble

J.W. Olney

Introduction

Les connaissances se sont largement accrues au cours des dix dernières années dans le domaine des aminoacides excitateurs (EAA). Non seulement les EAA endogènes tels que le glutamate (Glu) et l'aspartate (Asp) ont-ils été reconnus comme les principaux neurotransmetteurs présents dans la plupart des synapses excitatrices du système nerveux central des mammifères, il apparaît de plus en plus évident que leurs propriétés neurotoxiques (excitotoxiques) bien établies, ou celles de leurs analogues excitotoxiques, jouent un rôle important dans la pathophysiologie des maladies neurodégénératives. Trois sous-types de récepteurs des aminoacides excitateurs ont été reconnus, ceux de l'acide kaïnique (KA) et du N-méthyl-D-aspartate (NMDA) étant les mieux caractérisés à ce jour. Au milieu des années 70, le KA et son système récepteur a fait l'objet d'une attention considérable. Cependant, ces dix dernières années, l'attention s'est plutôt portée sur le système récepteur NMDA, car il semble intervenir dans de très nombreux processus neuro-physiologiques et pathologiques. On a isolé des antagonistes qui bloquent puissamment l'action excitatrice et neurotoxique des agonistes des EAA soit au récepteur du NMDA, soit au canal ionique correspondant; on est en voie de les mettre au point comme agents neuroprotecteurs potentiels dans le traitement des troubles neurologiques. Les accidents d'intoxication par des moules en 1987, où l'on a montré un rapport entre l'acide domoïque, qui s'attache aux récepteurs de KA, à un syndrome d'intoxication alimentaire neurodégénératif aigu, promet de soulever une nouvelle vague d'intérêt pour la participation éventuelle des récepteurs de KA dans les troubles neurodégénératifs chez l'homme. Il semble que les personnes âgées soient particulièrement vulnérables à la neurotoxicité de l'acide domoïque, ce qui suggère une sensibilité particulière chez elles des récepteurs de KA comme médiateurs de phénomènes excitotoxiques. Dans le présent article, je résumerai l'information portant sur les mécanismes excitotoxiques qui interviennent dans les processus neurodégénératifs en mettant l'accent sur les récepteurs de NMDA et de KA, car certaines données nous incitent à croire que les deux systèmes jouent un rôle important dans la neurotoxicité de l'acide domoïque.

Excitotoxicité : historique

Il y a une trentaine d'années, Curtis et Watkins et leurs collègues[1], à partir de nouvelles techniques microélectrophorétiques mises au point pour l'étude des propriétés de dépolarisation des membranes que possèdent le glutamate et certains composés apparentés, ont démontré les caractères structuraux nécessaires à l'interaction avec ce qui semblait être un récepteur des aminoacides excitateurs. Cependant, les innombrables rôles métaboliques du Glu, sa capacité d'exciter les neurones dans tout le système nerveux central (S.N.C.) et l'absence d'un quelconque mécanisme connu pour terminer son action excitatrice ont amené les neuroscientifiques des années 60 à le rejeter comme transmetteur éventuel. Cette opinion a persisté pendant deux décennies avant qu'on en arrive progressivement à reconnaître que le glutamate satisfait les critères d'un transmetteur. Enfin, dans les années 80, il est largement reconnu comme le transmetteur le plus plausible dans la plupart des synapses excitatrices dans le S.N.C. des mammifères.

Comme le Glu se trouve en très grande quantité dans le S.N.C. et qu'il a plusieurs fonctions métaboliques importantes, les premières expériences montrant que son administration par voie générale à des souris nouveau-nées détruit des neurones dans la rétine[2,3], ou dans certaines régions cérébrales[4], furent accueillies avec incrédulité. Cependant, les lésions du S.N.C. induites par l'administration de Glu par voie buccale ou sous-cutanée ont facilement été reproduites chez un certain nombre d'espèces animales, dont des primates[5]. En outre, il a été montré[6] que les analogues spécifiques du Glu (figure 1) reconnus comme ayant les mêmes propriétés neuroexcitatrices simulent les effets neurotoxiques du Glu, qu'ils ont une action excitatrice et toxique de puissance comparable et, enfin, que les analogues manquant d'activité excitatrice manquent également de neurotoxicité. D'autre part, les travaux portant sur l'ultrastructure[3,7] ont permis de localiser le site apparent de l'action toxique dans les membranes dendrosomiques postsynaptiques où se situent justement les récepteurs synaptiques excitateurs du Glu. L'ensemble des ces observations a donné naissance au concept d'excitoxicité selon lequel le Glu détruit les neurones par une activation excessive des récepteurs excitateurs sur les surfaces dendrosomiques des neurones.

Récepteurs des excitotoxines et médicaments anti-excitotoxiques

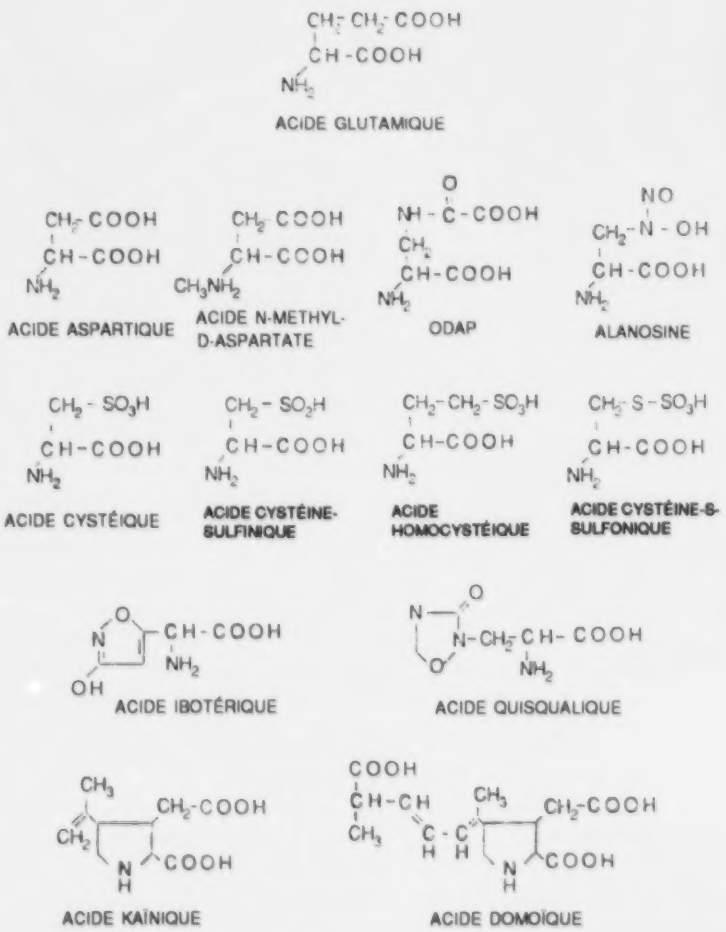
La découverte de sous-types de récepteurs d'EAA variant quant à leur sensibilité à l'égard d'agonistes donnés (NMDA, acide quisqualique, KA) et celle d'antagonistes qui bloquent l'action de ceux-ci ont été d'une importance capitale pour mieux comprendre les propriétés physiologiques et pathologiques des EAA comme transmetteurs[8,9]. Peu de temps après la reconnaissance des premiers antagonistes des EAA, on montrait qu'ils protègent les neurones de l'hypothalamus de souris *in vivo* contre les effets neurotoxiques du Glu et de son analogue plus puissant, le NMDA[10,11]. Cherchant à confirmer l'hypothèse de l'excitotoxicité, on a examiné de façon systématique de nombreux antagonistes potentiels des EAA *in vitro*; on a trouvé que leurs actions anti-excitotoxiques sont comparables, tant pour la puissance que pour la spécificité à l'égard des récepteurs, à leurs actions anti-excitatrices connues[12,13,14].

Depuis la mise en évidence de la participation des excitotoxines dans certains troubles non neurodégénératifs (voir ci-dessous), on s'intéresse

beaucoup plus au rôle possible des antagonistes des EAA comme précieux agent neuroprotecteurs en neurologie clinique. Le tableau 1 présente les résultats de plusieurs travaux sur les agonistes et les antagonistes des EAA[12,13,15,16]. La première génération d'antagonistes des EAA[9] est constituée d'antagonistes compétitifs du NMDA, qui rivalisent avec les agonistes du NMDA pour se lier à ses récepteurs. Ces agents, bien que possédant des propriétés antagonistes de puissance moyenne, sont d'une utilité incertaine pour les applications cliniques, car ils ne pénètrent pas bien la barrière hémato-encéphalique. Les médicaments anti-excitotoxiques les plus puissants connus à ce jour sont des antagonistes on compétitifs du NMDA qui agissent aux récepteurs de la phéncyclidine pour bloquer à la fois les actions excitatrices[17,18] et toxiques[12,13] du NMDA. Le MK-801, mis au point par Merck, Sharp and Dohme, est le composé le plus puissant connu dans cette catégorie. Puisque ces composés pénètrent la barrière hémato-encéphalique, ils présentent un intérêt thérapeutique potentiel. Certains médicaments actuellement commercialisés, comme le dextrométhorphan[19] et plusieurs antiparkinsoniens[15], sont des antagonistes non compétitifs du NMDA de puissance moyenne. Des antagonistes mixtes, tels que l'acide kynurénique et le dicarboxylate de cis-2,3-pipéridine, bloquent les effets excitotoxiques à la fois des agonistes du NMDA et des agonistes d'autres excitotoxiques (non NMDA), mais leur intérêt est limité à cause de leur faible puissance et de leur incapacité de pénétrer la barrière hémato-encéphalique. Le CNQX, une quinoxalinédione récemment décrite[20], a le grand privilège d'être le premier agent trouvé qui bloque les actions excitatrices[20] et excitotoxiques[21] des agonistes des non-NMDA, avec plus de puissance qu'il ne bloque les agonistes du NMDA. Certains thiobarbituriques pénétrant la barrière hémato-encéphalique sont de puissance moyenne contre les agonistes du NMDA et des non-NMDA.

Figure 1

Analogues structuraux excitotoxiques du Glu. On a découvert il y a de nombreuses années que la plupart des molécules représentées ici simulaient les propriétés neuroexcitatrices et neurotoxiques du Glu. Le domoate est une exception; cet aminoacide analogue du Glu fut d'abord isolé à partir d'algues par Takemoto [101]; Shinozaki [100] a montré qu'il avait une action neuroexcitatrice puissante; cependant, ce n'est que récemment qu'il a été examiné pour sa neurotoxicité. Les indications préliminaires suggèrent qu'il sera probablement l'excitotoxine la plus puissante qui ait été étudiée jusqu'à ce jour. ODAP = la lathyro-neurotoxine ß-N-oxalylamino-L-alanine, ayant également comme sigle BOAA.



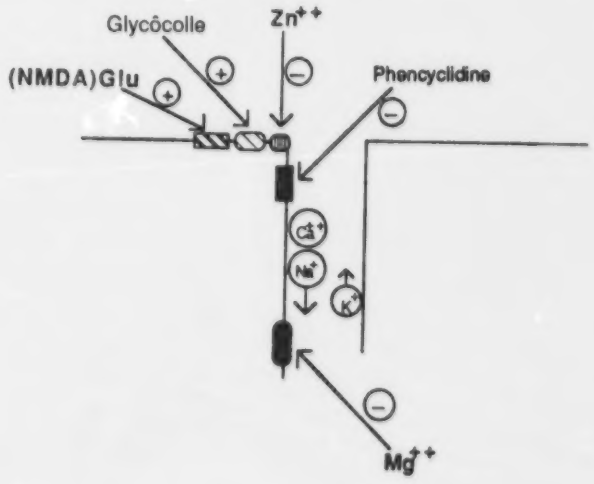
Destruction cellulaire aiguë ou retardée par les excitotoxiques

On a trouvé par des expériences de substitution ionique *in vitro* que plus d'un mécanisme intervient dans la dégénérescence neuronale induite par les excitotoxines. En culture de cellules de l'hippocampe[22] et dans la rétine isolée du poulet[23], les neurones dégénèrent très rapidement lorsqu'ils sont exposés durant une période continue de 30 minutes à une concentration toxique de Glu ou de tout autre de ses analogues excitotoxiques. Cette réaction toxique aiguë est abolie par le retrait du Na+ ou du Cl- du milieu d'incubation, mais n'est pas modifiée par le retrait du Ca^{++}. Cependant, Choi[24] a décrit un processus lent de dégénérescence déclenché par une brève exposition (5 min) des neurones de culture au Glu, processus qui est facilité par la présence du Ca^{++} dans le milieu d'incubation. Il est donc

Tableau 1.
Puissance relative des antagonistes dans le blocage de NMDA et de KA
Les chiffres donnent la concentration minimum en µM nécessaire pour protéger le récepteur contre 120 µM de NMDA et 25 µM d'acide kaïnique. Les doses essayées sont de 3000 µM ou moins. Le trait (-) indique qu'aucun blocage n'est survenu à 3000 µM

Antagoniste essayé	Contre NMDA (120 µM)	Contre KA (25 µM)
Antagonistes compétiteurs de NMDA	(µM)	(µM)
D-2-amino-5-phosphonopentanoate (AP5)	25	-
D-2-amino-5-phosphonoheptanoate (AP7)	75	-
D-alpha-aminoadipate	200	-
Antagonistes non compétiteurs de NMDA		
MK-801	0,1	-
Phencyclidine	0,5	-
Kétamine	5	-
(±) Cyclazocine	5	-
(+) SKF 10,047	10	-
Dextrométhorphan	50	-
Antiparkinsoniens		
Procyclidine (Kemadrin)	15	-
Ethopropazine (Parsidol)	25	-
Antagonistes mixtes des EAA		
CNQX	100	15
Acide kynurémique	300	750
Dicarboxylate de CIS-2,3-pipéridine	1000	2000
Barbituriques		
Thiamylal	50	250
Thiopental	200	400

Figure 2
Description schématique des divers constituants du complexe récepteur du NMDA-ionophore. De récentes découvertes suggèrent que le transmetteur endogène (présumément le Glu) libéré par la terminaison des axones présynaptiques active les récepteurs du NMDA sur les membranes dendrosomiques postsynaptiques, ce qui entraîne l'ouverture d'un canal cationique. Le glycocolle, agissant aux récepteurs insensibles à la strychnine qui sont co-localisés avec les récepteurs de NMDA, facilite l'ouverture de ce canal, alors que la phencyclidine, le ZN^{++} et le Mg^{++}, chacun d'eux agissant à un site distinct et selon des mécanismes présumément distincts, sont des antagonistes de la fonction du canal.



permis de croire que les excitotoxines peuvent détruire les neurones, soit par un processus fulminant dépendant du Na+ et du Cl- (mais non pas du Ca^{++}), soit par un processus lent dépendant du Ca^{++}. On aura noté que, dans ce dernier cas, la dégénérescence neuronale excitotoxique surviendra même si la durée d'exposition à une concentration anormale d'excitotoxines ne représente que le 1/6 de la durée d'exposition pratiquée dans le premier cas.

Caractères particuliers du récepteur de NMDA

Des trois types de récepteurs d'EAA (NMDA, Quis, KA) médiateurs d'effets excitotoxiques, celui qui a été le plus étudié et décrit comme étant le plus abondant et le plus largement distribué dans le S.N.C. des mammifères[25] est le récepteur de NMDA. Plusieurs caractères le distinguent des autres. Il correspond à un canal cationique dont la conductance du Ca^{++} est beaucoup plus élevée que celle des canaux ioniques des autres types de récepteurs[26] et qui est sujet à un blocage par Mg^{++} dépendant de la tension[27]. Ce récepteur de NMDA est en rapport étroit avec un récepteur du glycocolle insensible à la strychnine[28] qui facilite l'ouverture du canal ionique du NMDA, ainsi qu'aux récepteurs de la phencyclidine[17,18] qui, situés à l'intérieur de ce canal, permettent aux agonistes de la phencyclidine de bloquer l'ouverture du canal[29]. De plus, on a prouvé que le Zn^{++}, qui agit à un site distinct près de l'entrée du canal ionique du NMDA, agit comme inhibiteur de la fonction de celui-ci[30,31]. Ainsi, comme le montre la figure 2, le système récepteur de NMDA constitue une entité remarquablement complexe, dont la fonction normale dépend d'un équilibre dynamique entre divers facteurs facilitateurs et inhibiteurs. Il s'ensuit qu'un processus pathologique affectant l'un quelconque de ces facteurs pourrait créer un déséquilibre qui rendrait le système entier défaillant.

Récepteurs des non-NMDA

Si on possède une quantité considérable d'informations sur la nature et les propriétés physiologiques des récepteurs de NMDA, on en sait beaucoup moins sur les récepteurs de KA et encore moins sur les récepteurs de Quis. La plupart des observations

électrophysiologiques, particulièrement celles qui proviennent des préparations de cultures de cellules, n'ont fourni aucun critère permettant d'établir une distinction entre les récepteurs de KA et de Quis, d'où la tendance à citer les récepteurs d'EAA comme appartenant soit à la catégorie des récepteurs de NMDA, soit à celle des récepteurs de non-NMDA. Cependant, il est possible de montrer par autoradiographie une distribution différentielle entre les récepteurs de NMDA et de KA (figure 3). Bien que ces méthodes soient moins perfectionnées pour les récepteurs Quis, il apparaît assez clairement que les récepteurs Quis et KA ont aussi une distribution différente[25,32]. Il est clair également qu'il existe dans la rétine isolée de l'embryon de poulet des populations neuronales sensibles à la neurotoxicité de KA mais insensibles à celle du NMDA (figure 2) ou du Quis (non présenté). Il a même été démontré que l'action toxique de KA sur une certaine sous-population de neurones bipolaires rétiniens est bloquée par Quis[33], ce qui rend improbable que KA et Quis soient simplement des activateurs agonistes interchangeables du même complexe récepteur. Une des caractéristiques les plus remarquables du système récepteur de KA, comme le montre l'autoradiographie, est la concentration des récepteurs de KA dans la région CA3 de l'hippocampe[32] (figure 3). Bien qu'il reste à l'établir définitivement, il semble probable que ces récepteurs jouent un rôle important : ils rendraient compte d'une propriété de KA qui le distingue des autres excitotoxines, à savoir celle de provoquer un état convulsif limbique persistant (analysé plus en détail ci-dessous).

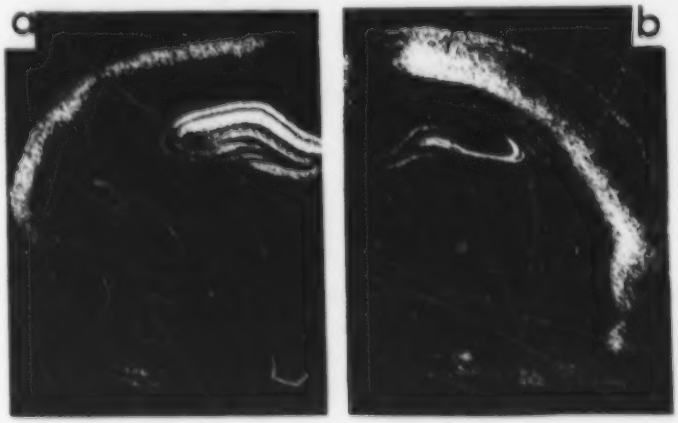
Excitotoxines et troubles neurodégénératifs

Étant donné leur présence dans le système nerveux central à de fortes concentrations et leur potentiel excitotoxique intrinsèque, on soupçonne depuis longtemps les aminoacides excitateurs, tels que le Glu et le Asp, de provoquer des troubles neurodégénératifs. Au cours des dix dernières années, on a commencé à avoir confirmation de ces soupçons, de même qu'on a commencé à accepter l'hypothèse qui en découle, à savoir que les récepteurs de NMDA seraient, dans beaucoup de cas, les principaux acteurs dans les processus neurodégénératifs. La participation des récepteurs de non-NMDA est également probable, mais il reste encore à la confirmer, vu, entre autres raisons, que les antagonistes sélectifs de ces récepteurs ne sont pas disponibles. Parmi les troubles neurodégénératifs dans lesquels on suppose qu'un mécanisme excitotoxique entre en jeu figurent le neurolathyrisme, la déficience en sulfite-oxydase, la dégénérescence olivopontocérébelleuse, la sclérose latérale amyotrophique, certaines hypoglycémies, l'épilepsie, l'anoxie, l'ischémie et les traumatismes du système nerveux central, l'encéphalopathie traumatique (*dementia pugilistica*), les maladies de Huntington, d'Alzheimer et de Parkinson [revue générale d'Olney[34]]. Étant donné le rôle possible des excitotoxines dans plusieurs de ces troubles neurologiques, un intérêt considérable s'attache actuellement à la possibilité que les antagonistes des excitotoxines (anti-excitotoxines) soient efficaces dans leur traitement ou leur prévention.

Efficacité des anti-excitotoxines dans la prévention des troubles neurodégénératifs

La capacité des anti-excitotoxines de prévenir les dégénérescences neuronales n'a pas été mise à l'essai chez l'homme; cependant, les expériences *in vivo* chez l'animal ont montré qu'elles protègent contre les lésions cérébrales résultant d'un état de mal épileptique[35,36,37,38], de l'hypoglycémie[39], de l'hypoxie/ischémie[40,41,42,43,44,45,99], des traumatismes du S.N.C.[46,47], de la carence en thiamine[48] et contre la toxicité de la méthamphétamine (servant de modèle de la maladie de Parkinson)[49]. La protection la plus spectaculaire a été obtenue dans l'état de mal épileptique, l'hypoglycémie et l'hypoxie/ischémie, surtout par les antagonistes non compétitifs du NMDA : le MK-801, la phencyclidine ou les deux. Comme on l'a indiqué ci-dessus, on a aussi isolé des agents qui agissent comme antagonistes aux récepteurs KA et Quis (tels le kynurénate et le CNQX), mais ces composés ne sont pas aussi puissants que les antagonistes les plus puissants du NMDA (p. ex., le MK-801), et ils ne pénètrent pas bien la barrière hémato-encéphalique.

Figure 3
Ces autoradiographies ont été obtenues à partir de coupes de cerveaux de rats incubés dans le ^{3}H-Glu (panneau a) ou dans du ^{3}H-KA (panneau b). La recette utilisée dans (a) favorise la liaison au récepteur du NMDA. Cette liaison domine; elle est particulièrement concentrée dans l'hippocampe (CA1) et les couches superficielles du cortex cérébral. À l'opposé, la liaison du KA (panneau b) est plus concentrée dans la région CA3 de l'hippocampe et dans les couches profondes du cortex cérébral.



Les remarquables propriétés excitotoxiques de l'acide kaïnique

Parmi les agents faisant l'objet d'études poussées de leur activité excitotoxique dans le système nerveux central des mammifères, le KA est le plus puissant[50]. Cependant, il est difficile de rapporter sa toxicité à sa seule action excitotoxique directe, car lorsque cet agent est injecté directement dans le cerveau, non seulement il exerce sur les neurones un effet nécrosant comparable à celui du Glu, mais, contrairement à celui-ci, il provoque des crises épileptiques persistantes et des lésions disséminées consécutives à ces crises dans diverses régions cérébrales éloignées du lieu d'injection[51,52,53,35]. De plus, lorsqu'il est administré par voie générale, il provoque encore des convulsions persistantes et les mêmes lésions cérébrales disséminées. Bien que la plupart des travaux sur le KA portent surtout sur le rat, Menini et coll.[54] ont démontré chez le babouin que l'injection de KA par voie intra-amygdaloïdienne cause des lésions cérébrales à la fois locales et éloignées; ces dernières suivent une distribution limbique et se manifestent par une activité épileptoïde de type limbique. On a observé une distribution analogue de lésions (cortex cérébral, hippocampe et thalamus) dans les cerveaux autopsiés de personnes épileptiques[55].

Le syndrome induit par le KA chez le rat possède les caractères distinctifs suivants : les comportements pré-convulsilfs débutent de 30 à 45 minutes après l'administration sous-cutanée de KA (12 mg/kg). On observe chez les animaux une fixité du regard, un clignement des yeux, des mouvements ballants de la tête et des frissons comme ceux d'un chien mouillé. Après un délai de 45 à 60 minutes, les animaux commencent à se cabrer sur leurs membres postérieurs avec des mouvements cloniques des membres antérieurs et de la tête; ils salivent et bavent abondamment. Si on les pousse, ils retrouvent leur équilibre sur leurs membres postérieurs et reprennent la posture «de prière» jusqu'à ce que la crise soit terminée. Si on agite un objet devant leurs yeux ou qu'on fait un geste menaçant, ils ne réagissent pas. Les épisodes de «redressement-prière-salivation» se répètent toutes les 2 à 5 minutes pendant 2 à 6 h. Les animaux qui ont des crises répétées à des intervalles de 2 à 5 minutes sont considérés comme en état de mal épileptique limbique. Les rats sacrifiés pour l'examen histopathologique du cerveau au bout d'une heure de crise de mal épileptique montrent inévitablement des lésions aiguës touchant certaines régions cérébrales, limbiques surtout, qui sont le siège de décharges excessives. Les régions les plus typiquement atteintes sont les cortex piriforme et entorhinien, le subiculum et l'hippocampe, le septum externe et plusieurs des noyaux amygdaloïdes et thalamiques. Le rapport étroit qui existe entre l'intensité des décharges neuronales et les lésions cérébrales induites par le KA a été démontré par plusieurs travaux utilisant des électrodes en profondeurprofondeur et l'autoradiographie au 2-désoxyglucose (2DG). L'activation manifestée soit par le tracé électrique, soit par le 2DG, s'étend à travers les régions cérébrales susdites selon un schéma spatio-temporel correspondant aux altérations neurodégénératives aiguës[35,56,57,58,59].

Le rôle des convulsions et des excitotoxines endogènes dans les lésions cérébrales induites par le KA

Afin de comprendre le rôle des convulsions dans les lésions cérébrales induites par le KA, nous avons entrepris une série d'expériences visant à déterminer si le même type de lésions cérébrales peut être reproduit par d'autres convulsivants ou d'autres moyens de provoquer une activité épileptique persistante affectant les régions limbiques. Nous avons trouvé qu'une grande variété de convulsivants (le dipépéridinoéthane, certains folates, la bicuculline, les agonistes cholinergiques et les inhibiteurs de la cholinestérase en association avec le lithium, les gaz anti-cholinestérase neuroplégiques comme le soman) induisent des crises persistantes lorsqu'ils sont administrés de la bonne façon. Inévitablement, lorsque de telles crises durent 1 heure, les premiers signes de dégénérescence neuronale peuvent être démontrés dans les régions cérébrales touchées par les décharges[53,60,61,62,63]. Puisque le type de cytopathologie semble le même dans chaque cas indépendamment de la méthode d'induction, et que dans chaque cas il ressemble à ce qu'on observe dans le noyau arciforme de l'hypothalamus après l'administration sous-cutanée de Glu[7], nous avons émis l'hypothèse que la libération et l'accumulation excessives du Glu endogène dans le voisinage des récepteurs d'EAA sont à l'origine de ce type de lésions cérébrales[64,65]. Poursuivant nos études sur le rôle hypothétique du Glu endogène, nous avons appliqué un stimulus prolongé (chimique ou électrique) sur certaines voies (corticothalmiques et perforantes) qui utiliseraient le Glu comme transmetteur et qui se terminent séparément dans des régions cérébrales (le thalamus et l'hippocampe, respectivement) dont on peut facilement analyser les altérations neuro-pathologiques. On produit ainsi de façon constante, dans les dendrites et les corps neuronaux post-synaptiques innervés par la voie glutamergique stimulée, des lésions comparables à celles que produit le Glu[66,67]. Nous avons aussi, au cours d'expériences d'hyperstimulation corticothalamique, démontré que les antagonistes des récepteurs de NMDA (MK-801, PCP ou kétamine) administrés par voie générale protègent contre ce type de lésions[68,38].

Prévenir les lésions cérébrales induites par le KA

Ben Ari et coll.[52] avaient démontré que l'anticonvulsivant diazépam empêche les convulsions et les lésions cérébrales éloignées, mais non les lésions locales induites par le KA injecté dans l'amygdaloïde. Nous avons trouvé que si certains anticonvulsivants (diazépam et phénobarbital) suppriment bien les crises induites par le KA et fournissent une protection significative contre les lésions cérébrales, d'autres anticonvulsivants (Dilantin®, valproate) n'inhibent ni les convulsions ni les lésions cérébrales[69]. Comme nous n'avons pas, dans ce travail, enregistré les crises par des électrodes en profondeur, nous ne pouvons pas savoir exactement dans quelle mesure les crises sont effectivement prévenues dans les régions sous-corticales. Récemment, nous avons trouvé que si les divers antagonistes non compétitifs du NMDA (MK-801, phencyclindine, kétamine) protègent toutes les régions cérébrales, à

l'exception du septum externe et de l'hippocampe CA3, contre les lésions résultant de convulsions induites par le KA, ils n'arrêtent pas l'activité épileptoïde dans les zones protégées, (comme le montrent les enregistrements par électrodes en profondeur)[36,37]. À titre provisoire, nous interprétons ces observations comme suit : ceux parmi les anticonvulsivants qui suppriment l'activité épileptoïde induite par le KA protègent contre les lésions cérébrales induites par le KA, parce que ce type de lésions est lié à l'activité épileptoïde prolongée et à la libération de Glu endogène. Considérant la capacité des antagonistes du NMDA de protéger contre les lésions cérébrales résultant de l'activité épileptoïde induite par le KA, nous supposons que ces crises sont déclenchées par l'interaction du KA et de ses récepteurs, probablement ceux qui sont concentrés dans la région CA3 de l'hyppocampe (figure 3), mais que la propagation de l'activité épileptoïde entraîne l'activation d'autres circuits et d'autres types de récepteurs, notamment les récepteurs de NMDA. Une activation excessive de ceux-ci (par le Glu endogène) provoquerait la destruction des neurones les abritant, leur blocage l'empêcherait. Cependant, le blocage des récepteurs de NMDA n'arrête pas l'activité épileptoïde susceptible d'être enregistrée électrographiquement, car celle-ci peut apparemment être entretenue par d'autres circuits transmetteurs une fois les récepteurs de NMDA bloqués.

Comparaisons entre l'intoxication par des moules chez l'homme et l'intoxication par le kaïnate chez le rat

D'après nos expériences préliminaires, l'acide domoïque est plus puissant que le KA pour détruire les neurones dans la rétine d'embryon de poulet ou pour provoquer des crises limbiques persistantes et les lésions cérébrales qu'elles induisent chez le rat adulte. Notre première impression est que l'acide domoïque possède un profil neurotoxique de type KA, mais en 3 à 5 fois plus puissant (Stewart, Price et Olney, non publié). Si ces données sont exactes, cela ajoutera foi à la conclusion du Ministère canadien de la santé selon laquelle cet acide a causé l'incident de 1987, puisque le type de lésions cérébrales et les symptômes observés lors des intoxications par les moules survenues au Canada sont presque identiques aux effets connus de KA sur le rat adulte. Même les troubles apparemment non neurogènes, tels instabilité cardiovasculaire et les perturbations digestives, s'expliquent aisément par ce qui est déjà connu des effets du KA sur le S.N.C., comme nous allons le voir.

Instabilité cardiovasculaire. Tallman et ses collègues[70] avaient montré que si l'application directe du KA sur les neurones du noyau du faisceau solitaire entraîne une baisse de la pression artérielle à des doses subtoxiques, elle peut causer une crise hypertensive maligne à des doses plus élevées. Ainsi, les oscillations rapides observées dans la pression artérielle lors des accidents survenus au Canada peuvent avoir été causées par une interaction de l'acide domoïque avec les récepteurs de KA sur les neurones du noyau du faisceau solitaire. Ce noyau du bulbe rachidien est situé à proximité immédiate de l'area postrema, région facilement pénétrée par les excitotoxines d'origine sanguine parce qu'elle est en-deçà de la barrière hémato-encéphalique.

Troubles digestifs. On sait depuis longtemps que le Glu est un émétique puissant lorsqu'il est administré par voie parentérale chez l'homme[71], et que ses analogues, comme le KA, sont également de puissants émétiques chez le chien et le singe[5,72,73]; Olney et coll., non publié], en outre, on a montré que l'injection directe de KA dans le S.N.C. du rat entraîne des troubles dans les organes périphériques, notamment la nécrose du muscle cardiaque, celle de la muqueuse vésicale et des ulcères gastro-intestinaux qui rappellent les ulcères dits de stress chez l'homme après un traumatisme crânien [74]; Olney et coll., non publié]. Les aminoacides excitateurs provoquent des vomissements en activant les neurones du centre chimiorécepteur réflexogène du vomissement situé dans l'area postrema à laquelle ces agents ont libre accès à partir du sang.

Convulsions et lésions cérébrales causées par elles. La propriété pour laquelle le KA est le mieux connu est sa capacité d'induire des convulsions prolongées et des lésions cérébrales qui touchent de nombreuses régions cérébrales limbiques et paralimbiques, tel l'hippocampe[35,50,52,64,69,75,76,77,78,79]. Quand on a fait l'autopsie des victimes de l'incident canadien, on a trouvé des lésions graves dans l'hippocampe et les régions limbiques; or les convulsions avaient été prolongées[80,81].

Mécanisme(s) de l'amnésie antérograde. Le récepteur de NMDA, sous-type du récepteur de Glu, a récemment été relié à la fonction de mémoire. En effet, les antagonistes du NMDA bloquent l'induction de la potentialisation à longue échéance (substratum physiologique hypothétique de la mémoire) à la fois *in vitro* et *in vivo*; de plus, on a montré qu'il diminue l'habileté de rats adultes dans des essais d'apprentissage et de mémoire[82,83,84,85,86]. Les observations sur le rôle des récepteurs NMDA dans la potentialisation à longue échéance proviennent surtout d'études portant plus particulièrement sur les neurones pyramidaux CA1 de l'hippocampe qui sont connus pour avoir la plus forte densité de récepteurs de NMDA dans le cerveau[25]. On pense donc à l'heure actuelle que les récepteurs de NMDA des neurones CA1 de l'hippocampe jouent un rôle important dans la mémoire et que la perte de ces neurones ou une dysfonction de leurs récepteurs de NMDA entraîne des défaillances mnésiques. Mais les informations se contredisent sur cette question. Handelmann et Olton[87] ont décrit des défaillances de la mémoire spatiale chez le rat après destruction des neurones CA3 par injection directe de KA dans l'hippocampe CA3, mais Jarrard[88] a fait une expérience semblable sans déceler d'effet important sur la mémoire. Il a été montré que l'ablation du noyau médiodorsal du thalamus (NMT) perturbe la mémoire chez le chat[89] et le singe[90,91]. Les récepteurs de NMDA peuvent être importants dans la physiologie des neurones de ce noyau, car il fait partie des régions cérébrales typiquement lésées lors des convulsions induites par le KA, et que ses neurones peuvent être protégées contre de telles lésions par un traitement préalable à un antagoniste du NMDA[36,37]. Notre discussion porte essentiellement sur les neurones CA1, CA3 et NMT, car ces trois populations neuronales partagent les caractéristiques suivantes: 1) toutes les

trois interviennent dans les fonctions de mémoire; 2) toutes les trois sont typiquement lésées lors des crises induites par le KA donné par voie générale; 3) enfin, toutes les trois ont été atteintes chez les victimes canadiennes d'intoxication.

Rapports entre l'excitotoxicité et l'âge

Puisqu'il y a une forte corrélation entre l'âge et la gravité des troubles neuropsychologiques chez les victimes d'intoxication par les moules, celle-ci augmentant avec l'âge, il est important de revoir ce que l'on sait sur l'âge comme facteur déterminant de sensibilité à la neurotoxocité de KA. On a montré que les récepteurs de KA, bien que présents en grande quantité dans le cerveau immature des jeunes rongeurs, sont relativement impuissants comme médiateurs de l'excitotoxicité[92]. En effet, une quantité de KA suffisante pour induire des lésions cérébrales généralisées chez le rat adulte peut être directement injectée dans le cerveau de très jeunes rats en provoquant une réaction neurodégénérative négligeable. L'inverse est vrai pour le NMDA : des quantités nanomolaires de NMDA qui ne causeraient aucune lésion cérébrale chez le rat adulte, peuvent être injectées unilatéralement dans le cerveau immature et entraîner une dégénération neuronale se manifestant bilatéralement à travers de nombreuses régions du cerveau en développement[93,94]. On pense actuellement que les récepteurs de NMDA, qui sont relativement hypersensibles dans le cerveau immature, sont exclusivement responsables des lésions cérébrales induites par des excitotoxines dans le S.N.C. en développement (p. ex., dans le cas de l'asphyxie périnatale); les récepteurs de KA deviendraient de plus en plus sensibles et les récepteurs de NMDA de moins en moins sensibles au fur et à mesure de la maturation. Que les personnes âgées se soient montrées particulièrement vulnérables aux troubles neuropsychologiques après l'intoxication par l'acide domoïque donne à penser que le récepteur de KA est aussi sensible, et peut-être même plus sensible, à un âge avancé qu'à n'importe quelle autre période de la vie. Bien que le système récepteur de NMDA devienne moins sensible entre la naissance et le début de l'âge adulte, aucune observation ne permet de dire que sa sensibilité continue à décroître avec le vieillissement. Nous croyons plutôt que la neurotoxicité de l'acide domoïque est provoquée par son interaction avec les récepteurs de KA, mais que la succession d'événements menant à des lésions cérébrales généralisées repose sur la formation de Glu endogène au voisinage des récepteurs de NMDA et, par conséquent, la dégénérescence excitotoxique des neurones abritant ces récepteurs. Si cette interprétation est exacte, les récepteurs de KA comme les récepteurs de NMDA peuvent être des médiateurs sensibles de l'excitotoxicité chez les personnes âgées.

Absorption digestive des excitotoxines

Puisque l'exposition à l'acide domoïque chez l'homme se produit par voie buccale, la question se pose de savoir s'il est absorbé librement dans le sang à partir du tube digestif. Si aucune donnée n'a été publiée sur cette question pour aucune espèce que ce soit, le fait que beaucoup de consommateurs canadiens ont manifesté les symptômes d'une intoxication du S.N.C. à la suite de l'ingestion de moules contenant de fortes concentrations de cet acide devrait être interprété comme une preuve *prima facie* que le tube digestif humain, au moins chez certains individus, l'absorbe effectivement. Les articles publiés sur le Glu sont instructifs à cet égard; un grand nombre de comparaisons entre les espèces a démontré que le Glu est absorbé par l'appareil gastro-intestinal de façon beaucoup plus efficace chez l'homme que chez toute autre espèce examinée jusqu'à ce jour. Par exemple, une dose donnée de Glu (150 mg/kg) administrée par voie buccale multiplie par vingt la quantité de Glu dans le sang chez l'homme, par 5 chez la souris, mais ne l'affecte nullement chez le singe[95,96]. On a également observé des différences extrêmes d'un sujet à l'autre chez l'homme adulte dans l'importance de l'élévation du Glu dans le sang provoquée par une dose buccale donnée. Comme je l'ai suggéré antérieurement[95,96], ces données soulèvent de sérieuses questions sur l'opportunité d'ajouter intentionnellement du Glu, de l'aspartate et toute autre excitotoxine dans les sources alimentaires de l'homme. La raison de l'inquiétude au sujet du Glu et de l'aspartate est qu'ils passent librement à travers la paroi gastro-intestinale de l'homme et qu'une fois dans le sang, ils passent librement dans certaines régions cérébrales qui ne sont pas protégées par la barrière hémato-encéphalique. Ceci peut être particulièrement dangereux pour les individus dont l'organisme est immature, car le Glu et l'aspartate interagissent de préférence avec les récepteurs de NMDA des neurones dans les régions cérébrales non protégées (p. ex., le noyau arciforme de l'hypothalamus); de plus, les récepteurs de NMDA ont chez les jeunes individus la particularité d'être particulièrement hypersensibles à la stimulation par le Glu et l'aspartate[93,94], ce qui rend les neurones abritant ces récepteurs hypervulnérables à la dégénérescence excitotoxiqué. À mon avis, il n'est pas raisonnable de permettre que des quantités non réglementées de Glu ou de tout autre excitotoxine contaminent les sources alimentaires de la planète (que la contamination soit intentionnelle ou non). Je considère particulièrement déraisonnable de prendre le risque que des populations soient exposées dans leur ensemble à une excitotoxine lorsqu'on a de bonnes raisons de croire que certaines sous-populations peuvent montrer une hypersensibilité au mécanisme toxique; ainsi les jeunes individus pourraient être hypervulnérables aux lésions hypothalamiques provoquées par le Glu (mécanisme NMDA), et les individus âgés à une dégénérescence limbique induite par l'acide domoïque (mécanisme KA).

Perspectives pour la protection du système nerveux central contre la neurotoxicité de l'acide domoïque

Puisqu'il est probable que l'intoxication par l'acide domoïque constituera une menace durable pour les consommateurs de fruits de mer et un défi permanent pour les médecins devant fournir un traitement d'urgence, il serait utile d'avoir un antidote efficace pour protéger le S.N.C. contre cette intoxication. Bien qu'il soit relativement facile par des méthodes *in vitro* de reconnaître les agents qui peuvent directement s'opposer à l'interaction de l'acide domoïque avec son récepteur, il

sera peut-être difficile d'appliquer les données obtenues dans ces expériences à une situation *in vivo*, car la plupart des agents actuellement disponibles qui bloquent les récepteurs KA tendent à avoir une faible solubilité en solution aqueuse et ne pénètrent pas facilement la barrière hémato-encéphalique. Par conséquent, en plus de chercher à mettre au point des antagonistes du KA à des fins neuroprotectrices, il est important d'explorer le potentiel neuroprotecteur de certaines autres catégories d'agents pharmacologiques.

Nous avons observé dans la rétine du poulet que les antagonistes de NMDA non compétitifs (MK-801, PCP, kétamine) ne bloquent pas la toxicité de KA même à de très fortes concentrations[12,13] mais chez le rat adulte *in vivo*, ils protègent de nombreuses régions cérébrales contre les altérations neurodégénératives typiquement observées après l'administration de KA[36,37] et, fait surprenant, ils confèrent cette protection sans réduction importante de l'activité épileptoïde dans les régions cérébrales protégées. Ainsi, en bloquant la participation des récepteurs de NMDA dans la tempête électrique que le KA provoque, on peut apporter une protection significative contre ses conséquences neurodégénératives sans calmer de façon appréciable la tempête elle-même. Bien que les antagonistes du NMDA ne confèrent pas une protection complète (p. ex., le septum latéral et l'hippocampe CA3 ne sont pas protégés), si on peut montrer qu'ils protègent d'autres régions du cerveau (amygdale, cortex piriforme et entorhinien, cortex insulaire, hippocampe CA1 et plusieurs noyaux thalamiques) contre la neurotoxicité de l'acide domoïque, ce serait nettement préférable à l'absence totale de thérapie neuroprotective.

Un deuxième principe devant être exploré est tout simplement l'utilisation d'anticonvulsivants; en effet, puisque ces lésions cérébrales induites par l'acide domoïque sont la conséquence des crises convulsives, la prévention de celles-ci éliminera la possibilité de lésions cérébrales. Nous avons estimé antérieurement la capacité de plusieurs anticonvulsivants de prévenir les lésions cérébrales induites par le KA et nous avons trouvé que certains d'entre eux (phénobarbital et diazépam) sont relativement efficaces, contrairement à d'autres (Dilantin[R], valproate) qui sont totalement inefficaces[69]. Il semblerait que les médecins canadiens chargés de soigner les patients intoxiqués par des moules en 1987 aient été surpris de constater que les divers anticonvulsivants courants étaient inefficaces pour faire cesser les crises. Plusieurs hypothèses se présentent alors : a) les convulsions induites par l'acide domoïque sont plus difficiles à bloquer que les convulsions induites par le KA; b) il est plus difficile de bloquer ce type de convulsions chez l'homme que chez le rat; c) les anticonvulsivants bloquent ce type de convulsions s'ils sont administrés *avant* le déclenchement, mais ils sont inefficaces lorsqu'ils sont administrés une fois les crises prolongées bien établies. Il faudra essayer divers agents pour vérifier l'efficacité des anticonvulsivants chez des rats auxquels l'acide domoïque aura été injecté selon deux protocoles : l'administration de l'anticonvulsivant avant l'acide, et à différents intervalles après. Le régime le plus pertinent, bien sûr, serait d'administrer l'anticonvulsivant dès manifestation évidente des crises (puisqu'il est peu probable qu'un médecin voie un individu empoisonné *avant* l'apparition de tels symptômes).

Il faudrait inclure les thiobarbituriques parmi les agents pharmacologiques à essayer, parce que ce sont des antagonistes de spectre large qui bloquent tous les sous-types de récepteurs d'EAA[16,97] et qu'ils pénètrent la barrière hémato-encéphalique. Au fait, ils sont les seuls antagonistes des EAA de spectre large actuellement disponibles qui le fassent. Il faudrait également essayer la procyclidine, un médicament antiparkinsonien à action anticholinergique et dont nous avons également démontré les propriétés antagonistes contre le NMDA[15]. Récemment, nous avons trouvé que cet agent bloque efficacement le syndrome lésions cérébrales-convulsions induit par une puissante toxine cholinergique, le soman[98], et qu'il est efficace même lorsqu'il est administré après le déclenchement des crises. Du fait que les propriétés anticholinergiques de la procyclidine sont plus fortes que son action antagoniste contre le NMDA, nous supposons que le principal mécanisme qui se trouve à la base de son action protectrice contre le soman est qu'il empêche la propagation des crises par les voies cholinergiques. Puisqu'il est possible que les crises induites par l'acide domoïque, bien qu'elles soient déclenchées par la stimulation des récepteurs KA, soient propagées à la fois par les voies cholinergiques et celles du NMDA, la capacité de la procyclidine de bloquer simultanément ces mêmes voies en fait un médicament intéressant à essayer pour empêcher la propagation des convulsions induites par l'acide domoïque.

En plus d'essayer des médicaments isolément pour connaître leur capacité de lutter contre la neurotoxicité de l'acide domoïque, on devrait faire des essais d'associations médicamenteuses (antagonistes NMDA, anticonvulsivants, thiobarbituriques, procyclidine, antagonistes des récepteurs KA) afin d'accroître l'efficacité neuroprotectrice sans entraîner d'effets secondaires graves. Ces catégories de médicaments présentant de fortes interactions potentiellement dangereuses pour la vie des malades lorsqu'ils sont associés, il est préférable de les essayer en laboratoire sur des rats plutôt que dans les salles d'urgence des hôpitaux.

Résumé

Je viens de passer en revue l'information concernant les aminoacides analogues du glutamate qui ont une action neurotoxique (excitotoxique) et j'ai signalé que le kaïnate est l'excitotoxine la plus puissante ayant fait l'objet de recherches intensives. Bien que très peu de résultats aient été publiés sur la neurotoxicité du domoate, tout porte à conclure que ses propriétés neuroactives sont transmises par les récepteurs du kaïnate. Les indications préliminaires selon lesquelles le domoate est un puissant inducteur d'un syndrome de lésions cérébrales-crises convulsives analogue à celui que produit le kaïnate chez les animaux d'expériences font croire au rôle des récepteurs du kaïnate dans la neurotoxicité du domoate. En outre, l'étroite ressemblance entre ce syndrome neurotoxique expérimental et les signes cliniques observés chez les victimes canadiennes d'intoxication par des moules renforce l'hypothèse que ces intoxications ont été causées par une interaction des molécules du domate

avec les récepteurs du kaïnate dans le système nerveux central.

Références

1. Curtis DR, Watkins JC. *Acidic amino acids with strong excitatory actions on mammalian neurones*. J Physiol (Lond) 1963; 166: 1-14.
2. Lucas DR, Newhouse JP. *The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina*. AMA Arch Ophthalmol 1957; 58: 193-201.
3. Olney JW. *Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion*. J Neuropathol Exp Neurol 1969; 28: 455-474.
4. Olney JW. *Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate*. Science 1969; 164: 719-721.
5. Olney JW, Sharpe LG, Feigin RD. *Glutamate-induced brain damage in infant primates*. J Neuropathol Exp Neurol 1972; 31: 464-488.
6. Olney JW, Ho OL, Rhee V. *Cytotoxic effects of acidic and sulphur-containing amino acids on the infant mouse central nervous system*. Exp Brain Res 1971; 14: 61-76.
7. Olney JW. *Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus: an electron microscopic study*. J Neuropathol Exp Neurol 1971; 30: 75-90.
8. Watkins JC. *Excitatory amino acids*. Dans: McGeer E, Olney JW, McGeer P, éds. *Kainic acid as a tool in neurobiology*. New York: Raven, 1978: 37-69.
9. Watkins JC, Evans RH. *Excitatory amino acid transmitters*. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1981; 21: 165-204.
10. Olney JW, deGubareff T, Labruyere J. *A-Aminoadipate blocks the neurotoxic action of N-methylaspartate*. Life Sci 1979; 25: 537-540.
11. Olney JW, Labruyere J, Collins JF, Curry K. *D-Aminophosphono-valerate is 100-fold more powerful than D-alpha-aminoadipate in blocking N-methylaspartate neurotoxicity*. Brain Res 1981; 221: 207-210.
12. Olney JW, Price MT, Fuller TA, et coll. *The anti-excitotoxic effects of certain aesthetics, analgesics and sedative-hypnotics*. Neurosci Lett 1986; 68: 29-34.
13. Olney J, Price M, Shahid Salles K, Labruyere J, Frierdich G. *MK-801 powerfully protects against N-methyl aspartate neurotoxicity*. Eur J Pharmacol 1987; 141: 357-361.
14. Choi DW, Koh J, Peters S. *Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: Attenuation by NMDA antagonists*. J Neurosci 1988; 8: 185-196.
15. Olney JW, Price MT, Labruyere J. *Anti-parkinsonian agents are phencyclidine agonists and N-methyl aspartate antagonists*. Eur J Pharmacol 1987; 142: 319-320.
16. Olney JW, Price MT, Labruyere J, Mueller M, Silverman E. *Comparative efficacy of thiobarbiturates and other agents in preventing glutamate-induced or ischemic neuronal degeneration in chick retina*. Neurosci Abst 1987; 13: 1030.
17. Lodge D, Anis NA. *Effects of phencyclidine on excitatory amino acid activation of spinal interneurones in the cat*. Eur J Pharmacol 1982; 77: 203-204.
18. Lodge D, Aram JA, Church J, et al. *Excitatory amino acids and phencyclidine-like drugs*. Dans: Hicks TP, Lodge D, McLennan H, éds. *excitatory amino acid transmission*. New York: Alan R Liss Inc 1987: 83-90.
19. Goldberg MP, Pham P, Choi DW. *Dextrorphan and dextromethorphan attenuate hypoxic injury in neuronal culture*. Neurosci Lett 1987; 80: 11-15.
20. Honore T , Davies SN, Drejer J, et coll. *Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists*. Science 1988; 241: 701-703.
21. Price MT, Honore T, Mueller ME, Labruyere J, Silverman E, Olney JW. *CNQX potently and selectively blocks kainate excitotoxicity in the chick embryo retina*. Neurosci Abst 1988; 14: 418.
22. Rothman SM. *Excitatory amino acid neurotoxicity is produced by passive chloride influx*. J Neurosci 1985; 6: 1483-1489.
23. Olney JW, Price MT, Samson L, Labruyere J. *The role of specific ions in glutamate neurotoxicity*. Neurosci Lett 1986; 65: 65-71.
24. Choi DW. *Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent*. Neurosci Lett 1985; 58: 293-297.
25. Monoghan DT, Cotman CW. *Distribution of N-methyl-D-aspartate sensitive $L^{3}H$-glutamate-binding sites in rat brain*. J Neurosci 1985; 5: 2909-2919.
26. MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL. *NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones*. Nature 1986; 321: 519-522.
27. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. *Voltage-dependent block by $Mg2^{\pm}$ of NMDA responses in spinal cord neurones*. Nature 1984; 309: 261-263.
28. Johnson JW, Ascher P. *The NMDA receptor and its channel. Modulation by magnesium and by glycine*. Dans: Lodge D, éd. *Excitatory amino acids in health and disease*. London: John Wiley & Sons Ltd, 1988: 143-164.
29. MacDonald JF, Miljkovic Z, Pennefather P. *Use-dependent block of excitatory amino acid currents in cultured neurons by ketamine*. J Neurophysiol 1987; 58: 251-266.

30. Westbrook GL, Mayer ML. *Micromolar concentrations of Zn^{++} antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurones*. Nature 1987; 328: 640.

31. Reynolds IJ, Miller RJ. *[^{3}H]MK-801 binding to the NMDA receptor/ionophore complex is regulated by divalent cations: evidence for multiple regulatory sites*. Eur J Pharmacol 1988; 151: 103-112.

32. Monoghan DT, Yao D, Cotman CW. *[^{3}H]-glutamate binds to kainate-, NMDA- and AMPA-sensitive binding sites: an autoradiographic analysis*. Brain Res 1985; 340: 378-383.

33. Mosinger JL, Price MT, Labruyere J, Mueller ME, Silverman E, Olney JW. *Glutamate blocks kainate neurotoxicity in the chick embryo retina*. Neurosci Abst 1988; 14: 417.

34. Olney JW. *Excitotoxins and neuropsychiatric disorders*. Biol Psychiatry (sous presse).

35. Olney JW, Collins RC, Sloviter RS. *Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage*. Dans: Delgado-Escueta AV, Ward AA, Woodbury DM, Porter RJ, éds. *Basic mechanisms of the epilepsies: molecular and cellular approaches*. New York: Raven Press, 1986: 857-878.

36. Labruyere J, Fuller TA, Olney JW, Price MT, Zorumski C, Clifford D. *Phencyclidine and ketamine protect against seizure-related brain damage*. Neurosci Abst 1986; 12: 344.

37. Clifford DB, Olney JW, Benz AM, Fuller TA, Zorumski CF. *Ketamine and phencyclidine protect against seizure-related brain damage*. Epilepsia (sous presse).

38. Clifford DB, Zorumski CF, Olney JW. *Ketamine and MK-801 prevent degeneration of thalamic neurons induced by focal cortical seizures*. Exp Neurol (sous presse).

39. Wieloch T. *Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist*. Science 1985; 230: 681-683.

40. Simon RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS. *Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain*. Science 1984; 226: 850-852.

41. Gill R, Foster AC, Woodruff GN. *Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil*. J Neurosci 1987; 7: 3343-3349.

42. Park C, Nehls DG, Ozyurt E, Graham DI, McCulloch J. *Ischemic brain damage is reduced by systemic administration of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist, MK-801*. Neurosci Abst 1987; 13: 1029.

43. Lawrence JJ, Fuller TA, Olney JW. *MK-801 and PCP protect against ischemic neuronal degeneration in the gerbil hippocampus*. Neurosci Abst 1987; 13: 1079.

44. Kochhar A, Zivin JA, Lyden PD, Mazzarella V. *Glutamate antagonist therapy reduces neurologic deficits produced by focal central nervous system ischemia*. Arch Neurol 1988; 45: 148-153.

45. Olney JW, Ikonomidou C, Mosinger JL, Frierdich G. *MK-801 prevents hypobaric-ischemic neuronal degeneration in infant rat brain*. J Neurosci (sous presse).

46. Hayes RL, Chapouris R, Lyeth BG, et coll. *Pretreatment with phencyclidine (PCP) attenuates long-term behaviourial deficits following concussive brain injury in the rat*. Neurosci Abst 1987; 13: 1254.

47. Faden AI, Simon RP. *N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 improves outcome following experimental spinal cord injury in rats*. Neurosci Abst 1987; 13: 1031.

48. Langlais PJ, Mair RG, Mcentee WJ. *Acute thiamine deficiency in the rat: brain lesions, amino acid changes and MK-801 pretreatment*. Neurosci Abst 1988; 14: 774.

49. Sonsalla PK, Nicklas WJ, Heikkila RE. *(+)MK-801 protects against methamphetamine (METH)-induced, but not MPTP-induced, neurotoxicity in mice*. Neurosci Abst 1988; 14: 1216.

50. Olney JW, Rhee V, Ho OL. *Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate*. Brain Res 1974; 74: 507-512.

51. Olney JW, deGubareff T. *Extreme sensitivity of olfactory cortical neurons to kainic acid toxicity*. Dans: *Kainic acid as a tool in neurobiology*. McGeer E, Olney JW, McGeer P, éds. New York: Raven, 1978: 201-217.

52. Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP, Meldrum BS. *The role of epileptic activity in hippocampal and 'remote' cerebral lesions induced by kainic acid*. Brain Res 1980; 191: 79-97.

53. Olney JW, Fuller TA, deGubareff T, Labruyere J. *Intra-striatal folic acid mimics the distant but not local brain damaging properties of kainic acid*. Neurosci Lett 1981; 25: 207-210.

54. Menini C, Meldrum BS, Riche D, Silva-Comte C, Stutzmann JM. *Sustained limbic seizures induced by intra-amygdaloid kainic acid in the baboon: symptomatology and neuropathological consequences*. Ann Neurol 1979; 8: 501-509.

55. Corsellis JAN, Meldrum BS. Dans: Blackwood W, Corsellis JAN, éds. *Greenfield's neuropathology*. 3ième éd. London: Arnold, 1976: 771-795.

56. Collins RC, McLean M, Lochman EW, Klunk W, Olney JW. *Kainic acid causes limbic seizures*. Epilepsia 1980; 21: 186.

57. Collins RC, McLean M, Olney JW. *Cerebral metabolic response to systemic kainic acid: 14-C-deoxyglucose studies*. Life Sci 1980, 27: 855-862.

58. Collins RC, Lothman EW, Olney JW. *Status epilepticus in the limbic system – biochemical and pathological changes*. Dans: Delgado-Escueta AV, Wasterlain CG, Treiman DM, Porter RJ, éds. *Advances in neurology*. Vol 34 - *Status epilepticus*. New York: Raven, 1983: 277-288.

59. Collins RC, Olney JW, Lothman ER. *Metabolic and pathological consequences of focal seizures*. Dans: Ward Jr AA, éd. *Epilepsy*. New York: Raven, 1983: 87-107.

60. Olney JW, Fuller TA, Collins RC, deGubareff T. *Systemic dipiperidinoethane mimics the convulsant and neurotoxic actions of kainic acid*. Brain Res 1980; 200: 231-235.

61. Olney JW, deGubareff T, Labruyere J. *Seizure-related brain damage induced by cholinergic agents*. Nature 1983; 301: 520-522.

62. Honchar MP, Olney JW, Sherman WS. *Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats*. Science 1983; 220: 323-325.

63. Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. *The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures*. Neurosci 1987; 23: 953-968.

64. Olney JW. *Kainic acid and other excitotoxins: a comparative analysis. in:* DiChiara G, Gessa GL, éds. *Glutamatigasa neuro-transmitter*. New York: Raven, 1981: 375-384.

65. Olney JW. *Inciting excitotoxic cytocide among central neurons*. Dans: *Excitatory amino acids and epilepsy*. Schwarcz R, Ben-Ari Y, éds. New York: Plenum, 1986: 631-645.

66. Collins RC, Olney JW. *Focal cortical seizures cause distant thalamic lesions*. Science 1982; 218: 177-179.

67. Olney JW, deGubareff T, Sloviter RS. *"Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. II. Ultrastructural analysis of acute hippocampal pathology*. Brain Res Bull 1983; 10: 699-712.

68. Clifford DB, Benz A, Olney JW, Zorumski CF. *MK-801 prevents seizure-related brain damage from pilocarpine and lithium-pilocarpine epidural well-induced seizures*. Neurosci Abst 1988; 14: 863.

69. Fuller TA, Olney JW. *Only certain anticonvulsants protect against kainate neurotoxicity*. Neurobehav Toxicol Teratol 1981; 3: 355-361.

70. Talman WT, Perrone MH, Reis DJ. *Acute hypertension after the local injection of kainic acid into the nucleus tractus solitarii of rats*. Circ Res 1981; 48: 292-298.

71. Levey S, Harroun JE, Smyth CJ. *Serum glutamic acid levels and the occurrence of nausea and vomiting after the intravenous administration of amino acid mixtures*. J Lab Clin Med 1949; 34: 1238-1249.

72. Madden SC, Woods RR, Schull FW, Remington JH, Whipple GH. *Tolerance to amino acid mixtures and casein digests given intravenously. Glutamic acid responsible for reactions*. J Exp Med 1945; 81: 439-448.

73. Unna K, Howe EE. *Toxic effects of glutamic and aspartic acid*. FASEB J 1945; 4: 138.

74. McGeer PL, Galabru CK, McGeer EG, Boyko WJ. *Diencephalic injections of kainic acid produce myocardial necrosis*. Neurosci Abst 1979; 5: 515.

75. Olney JW, Fuller T, deGubareff T. *Acute dendrotoxic changes in the hippocamlpus of kainate-treated rats*. Brain Res 1979; 176: 91-100.

76. Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. *Preferential vulnerability of hippocampus to intra-ventricular kainic acid*. Dans: McGeer E, Olney JW, McGeer P, éds. *Kainic acid as a tool im neurobiology*. New York: Raven, 1978: 219-237.

77. Fuller TA, Olney JW. *Effects of morphine or naloxone on kainic acid neurotoxicity*. Life Sci 1979; 24: 1793-1798.

78. Schwob JE, Fuller T, Price JL, Olney JW. *Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intra-cerebral injections of kainic acid: a histological study*. Neuroscience 1980; 5: 991-1014.

79. Olney JW. *Neurotoxicity of excitatory amino acids*. Dans: McGeer E, Olney JW, McGeer P, éds. *Kainic acid as a tool in neurobiology*. New York: Raven Press, 1978: 95-121.

80. Debonnel G, Teitelbaum J, Carpenter SL, et coll. *The "Mussel toxin," domoic acid, produces its neurotoxic effect through kainate receptor: clinical and electrophysiological studies*. Soc Neurosci Abst 1988; 14: 240.

81. Debonnel G, Beauchesne L, de Montigny C. *Domoic acid, the alleged "mussel toxin," might produce its neurotoxic effect through kainate receptor activation: an electrophysiological study in the rat dorsal hippocampus*. Can J Physiol Pharmacol 1989; 67: 29-33.

82. Collingridge GL, Bliss TVP. *NMDA receptors: their role in long-term potentiation*. Trends Neurosci 1987; 10: 288-293.

83. Coan EJ, Saywood W, Collingridge GL. *MK-801 blocks NMDA receptor-mediated synaptic transmission and long-term potentiation in rat hippocampal slices*. Neurosci Lett 1987; 80: 111-114.

84. Morris RGM, Andersen E, Lynch GS, Baudry M. *Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5*. Nature 1986; 319: 774-776.

85. Handelmann GE, Contreras PC, O'Donohue TL. *Selective memory impairment by phencyclidine in rats*. Eur J Pharmacol 1987; 140: 69-73.

86. Wozniak DF, Olney JW, Kettinger III L. *Effects of MK-801 on memory retention in the rat*. Neurosci Abst 1988; 14: 941

87. Handelmann GE, Olton DS. *Spatial memory following damage to hippocampal CA3 pyramidal cells with kainic acid: Impairment and recovery with preoperative training*. Brain Res 1981; 217: 41-58.

88. Jarrard LE. *Selective hippocampal lesions and behaviour: effects of kainic acid lesions on performance of place and cue tasks*. Behav Neurosci 1983; 97: 873-889.

89. Markowitsch HJ. *Retention performance of a learned delayed-alternation task after chemical lesions of the cat's mediodorsal nucleus*. Behav Brain Res 1982; 4: 263-277.

90. Isseroff A, Rosvold HE, Galkin TW, Goldman-Rakic PS. *Spatial memory impairments following damage to the mediodorsal nucleus in the thalamus of rhesus monkeys*. Brain Res 1982; 232: 97-113.

91. Zola-Morgan S, Squire LR. *Amnesia in monkeys after lesions of the mediodorsal nucleus of the thalamus*. Ann Neurol 1985; 17: 558-564.

92. Campochiaro P, Coyle JT. *Ontogenetic development of kainate neurotoxicity: correlates with glutamatergic innervation*. Proc Natl Acad Sci 1978; 75: 2025-2029.

93. McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV. *Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system*. Brain Res 1988; 459: 200-203.

94. Ikonomidou C, Mosinger JL, Shahid Salles K, Labruyere J, Olney JW. *Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methyl-aspartate neurotoxicity*. J Neurosci (sous presse).

95. Olney JW. *Excitatory neurotoxins as food additives: an evaluation of risk*. Neurotoxicology 1980; 2: 163-192.

96. Olney JW. *Excitotoxic food additives – relevance of animal studies to human safety*. Neurobehav Toxicol Teratol 1984; 6: 455-462.

97. Olney *JW*. *Endogenous excitotoxins and neuropathological disorders*. In: *excitatory amino acids in health and disease*. Lodge D, éd. London: John Wiley & Sons Ltd, 1988; 337-351.

98. Price MT, Stewart GR, Olney JW. *Procyclidine protects against soman neurotoxicity, even when administered after onset of convulsions*. Neurosci Abst (in press).

99. McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV. *MK-801 protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic damage*. Eur J Pharmacol 1987; 140: 359-361.

100. Shinozaki H. *Discovery of novel actions of kainic acid and related compounds*. Dans: McGeer E, Olney JW, McGeer P, éds. *Kainic acid as a tool in neurobiology*. New York: Raven, 1978: 1736.

101. Takemoto T. *Isolation and structural identification of naturally occurring excitatory amino acids*. Dans: McGeer E, Olney JW, McGeer P, éds. *Kainic acid as a tool in neurobiology*. New York: Raven, 1978: 1-15.

Discussion

S. Carpenter, Montréal : Vous avez dit que le produit MK-801 protégerait trois aires, l'aire CA3, le noyau septal externe, mais je crois qu'il y a une autre aire.

J. Olney : Voici, le MK-801 ne protège pas l'aire CA3 et le septum externe. Mais il protège le noyau amygdalien, le cortex de l'aire piriforme et plusieurs noyaux thalamiques. Ce sont les principales formations qui sont lésées par les convulsions provoquées par l'acide kaïnique.

Incidemment, nous avons placé des électrodes profondes afin de mesurer l'activité épileptoïde et nous avons constaté que l'activité continue dans toutes les régions où le MK-801 a un action protectrice. Ainsi, nous croyons que d'autres systèmes de transmetteurs maintiennent l'activité épileptoïde et les lésions ne sont pas dues à l'activation des récepteurs du N-méthylaspartate.

W. Watson-Wright, Halifax : Je me demande si, à votre connaissance, il y a des récepteurs du kaïnate dans l'*area postrema*?

J. Olney : Je crois qu'il s'agit d'une question intéressante en rapport avec les symptômes de l'intoxication par l'acide domoïque. L'*area postrema* est une région chimioréceptrice déclenchant le vomissement; le glutamate est un émétique, de même que l'aspartate et tous les acides aminés excitateurs. Nous croyons qu'ils provoquent le vomissement en excitant les cellules nerveuses de l'*area postrema*. L'acide kaïnique est un puissant émétique. Je ne connais pas les résultats de l'expérimentation animale dans le cas de l'acide domoïque, mais je crois savoir qu'il provoque des vomissements chez l'humain. Par conséquent, il doit y avoir des récepteurs de l'acide kaïnique dans l'*area postrema* et nous croyons que c'est par ce mécanisme que le vomissement est provoqué.

M. Ball, London : Nous avons appris hier qu'une toxine, l'acide domoïque, a été isolée d'une diatomée faisant partie du phytoplancton que l'on retrouve dans certains estuaires. Pour pouvoir appliquer ces connaissances aux maladies neuro-dégénératives à évolution prolongée comme la maladie d'Alzheimer, qui est omniprésente au sein de la population, on serait porté à postuler l'existence d'une neurotoxine alimentaire beaucoup plus répandue. Avez-vous trouvé dans la documentation scientifique antérieure dont vous avez parlé des indications que l'acide domoïque a déjà été décelé dans des denrées alimentaires courantes en Orient ou, même, n'importe où ailleurs dans le monde?

J. Olney : Je crois que l'acide domoïque et l'acide kaïnique ont été utilisés dans le passé au Japon, souvent dans des régions éloignées et pas nécessairement dans l'ensemble de la population. Ces produits, considérés comme des anthelminthiques intestinaux, et étaient ingérés sous forme d'algues marines séchées, par exemple, et pulvérisées. On prétendait que cela détruisait les vers intestinaux. Par la suite, les Japonais ont isolé l'acide kaïnique et entrepris une vaste opération qui a duré quelque temps et qui consistait à l'administrer aux écoliers – 20 000 écoliers à la fois – pour détruire le réservoir de vers intestinaux qui provoquaient sans cesse des réinfestations au sein de la population. On ignore si l'acide kaïnique a causé des

effets toxiques chez les écoliers parce qu'il était administré en même temps qu'un autre anthelminthique, la santonine, dont on savait déjà qu'il a certains effets neurotoxiques; si de tels effets sont survenus par suite de l'administration de cette association, les auteurs ont d'emblée incriminé la santonine et n'ont même pas pensé à la possibilité qu'ils pussent être causés par l'acide kaïnique. Cependant, il faut soulever un autre point : chez les rongeurs, du moins, l'acide kaïnique n'est pas très toxique pour le système nerveux central du nourrisson et ne devient une toxine puissante pour le cerveau que lorsque ce dernier atteint sa maturité. Ainsi, il est possible qu'en faisant consommer de l'acide kaïnique à un grand nombre d'écoliers, quelle qu'ait été la quantité d'acide kaïnique absorbée par le tractus gastro-intestinal, le produit n'ait pas été très toxique pour le cerveau en raison de leur âge.

L. Tryphonas : Pourriez-vous vous étendre davantage sur la signification des lésions astrocytaires observées dans les cerveaux lésés par des acides aminés excitateurs?

J. Olney : Il y a une hypertrophie astrocytaire que nous ne considérons pas comme une manifestation excitotoxique primaire, mais plutôt comme une sorte de réaction. Nous ne savons pas exactement quel est le mécanisme de l'hypertrophie gliale. L'autre réaction gliale, celle que nous avons observée dans le striatum, est une prolifération: des cellules gliales s'hypertrophient et qui migrent dans la région. Mais le premier de ces types de réaction gliale est une simple hypertrophie que nous croyons réversible; je ne crois pas qu'il s'agisse du même mécanisme que dans le cas de la réaction neuronale.

Question provenant de la salle : Hier, on a dit que les malades traités pour intoxication par l'acide domoïque avaient d'abord reçu des anticonvulsivants et que leurs convulsions se sont révélées très difficiles à traiter. Nous pouvons supposer que néanmoins, cette pratique a pu avoir du bon, étant donné que vous avez pu démontrer que les anticonvulsivants prévenaient les lésions distantes, mais non les lésions locales. Deuxièmement, je sais que nous aurons plus tard une séance sur la thérapie, mais pourriez-vous dire quelque chose sur le rôle possible des associations d'anticonvulsivants, pour prévenir ces lésions distantes, et d'antagonistes des récepteurs, pour prévenir les lésions locales, dans le traitement de cette affection.

J. Olney : J'ignore quels anticonvulsivants ont été utilisés. Je penserais que le diazépam, administré à dose élevée par voie intraveineuse, serait probablement le type d'anticonvulsivant indiqué et j'ignore si on s'en est servi. Cette approche ressemble à celle que l'on utilise dans le cas de l'état de mal épileptique; il est possible que les crises qui sont survenues chez les personnes ayant ingéré de l'acide domoïque aient été assez discrètes pour que personne ne les considère comme un état de mal épileptique; peut-être les médecins traitants n'ont-ils pas utilisé les anticonvulsivants avec autant de hardiesse qu'ils l'auraient fait s'ils avaient été pleinement conscients qu'ils étaient devant des malades en état de mal épileptique prolongé. Quoi qu'il en soit, je crois qu'il serait préférable en pareil cas de recourir au diazépam intraveineux à fortes doses. L'association d'un inhibiteur de NMDA et d'un autre anticonvulsivant pourrait avoir du bon sens, mais je craindrais alors les effets sédatifs combinés possibles de ces deux catégories de médicaments; et il faudrait procéder à des essais chez les animaux de laboratoire pour s'assurer que cette association n'entraîne pas une dépression grave du système nerveux central. Par exemple, le diazépam cause une dépression ou une inhibition par l'intermédiaire de la voie GABAergique et si, en plus, vous déprimez le système excitateur principal du cerveau en utilisant un antagoniste des récepteurs de NMDA, vous risquez de transformer la dépression en décès. C'est pourquoi, je pense qu'il faudrait essayer cette association chez des animaux de laboratoire. Mais si l'on ne devait utiliser qu'un antagoniste du N-méthylaspartate comme le MK-801, on peut s'attendre à prévenir les lésions cérébrales, mais non les convulsions. Si l'on veut prévenir les deux, il faudrait recourir à une association quelconque. J'aimerais également ajouter que nous avons étudié d'une manière assez poussée l'association MK-801 et phencyclidine; un article paraîtra dans *Science* dans quelques mois, où on décrit induites par ces agents, la vacuolisation de certains corticoneurones. Cette action est tout à fait distinct des effets neuroprotecteurs que ces agents exercent sur d'autres neurones. Voilà qui complique la situation pour ce qui est de l'utilisation de ces composés comme agents neuroprotecteurs. Évidemment, on pense aussi qu'ils ont des effets psychodysleptiques; s'il s'agit uniquement d'une psychose passagère, peut-être qu'on voudra l'accepter en échange d'une protection contre des lésions cérébrales permanentes, mais il reste qu'il s'agit d'une considération importante.

13. Neurotoxicité de l'acide domoïque : Médiation par le récepteur du kaïnate – Études électrophysiologiques chez le rat

G. Debonnel, M. Weiss et C. de Montigny

Résumé

L'acide domoïque, un analogue structural de l'acide kaïnique, a été reconnu comme la toxine causant l'intoxication sévère présentée en 1987 par plus de cent cinquante personnes ayant consommé des moules de l'Île-du-Prince-Édouard (Canada). Les études électrophysiologiques que nous présentons, réalisées sur des neurones pyramidaux des régions CA1 et CA3 de l'hippocampe dorsal du rat, ont pour but d'étudier, *in vivo*, l'effet d'applications microiontophorétiques d'acide domoïque et d'acide kaïnique en comparant leur efficacité à celle d'agonistes des deux autres sous-types de récepteurs glutamatergiques, ou de neuropeptides. L'activation par l'acide domoïque et l'acide kaïnique est plus de 20 fois plus puissante en CA3 qu'en CA1, alors qu'il n'existe pas de telle différence régionale pour toutes les autres substances essayées. Aussi bien en CA1 qu'en CA3, l'acide domoïque est trois fois plus puissant que l'acide kaïnique. Une lésion sélective du système des fibres moussues originaires du gyrus dentatus se projetant dans la région CA3 de l'hippocampe dorsal réduit fortement l'effet excitateur de l'acide kaïnique et de l'acide domoïque dans cette région, sans affecter la réponse aux autres substances. Plusieurs classes d'agents pharmacologiques ont été essayées afin de déterminer quel pourrait être le meilleur antagoniste de l'acide kaïnique et de l'acide domoïque. Parmi ces agents, seules les benzodiazépines ont pu diminuer sélectivement le taux d'activation induit par l'acide kaïnique, quoiqu'avec une efficacité moindre en CA3 qu'en CA1. Ces résultats démontrent que l'acide domoïque est un agoniste puissant des récepteurs du kaïnate et que, dans la région CA3, il pourrait produire ses effets neurotoxiques par l'activation de ceux qui sont situés sur les terminaisons des fibres moussues. Enfin, advenant une nouvelle vague d'intoxications, nos résultats font croire qu'un traitement rapide par de hautes doses de benzodiazépines permettrait peut-être de prévenir la survenue de lésions importantes et irréversibles à l'hippocampe.

Introduction

L'acide domoïque a été désigné comme la substance causale de l'intoxication, en 1987, de plus de cent cinquante personnes ayant consommé des moules de l'Île-du-Prince-Édouard[51]. L'acide domoïque, un analogue structural de l'acide kaïnique (KA)[6,45], fait partie de la série des acides aminés dicarboxyliques qui suscient de plus en plus d'intérêt, dans la mesure où il semble qu'un certain nombre d'entre eux puissent jouer un rôle dans l'étiopathogénie ou dans le traitement de plusieurs maladies neurologiques ou psychiatriques: épilepsie temporale, maladie de Huntington, maladie d'Alzheimer, parkinsonisme, schizophrénie[2,3,9,21,27,28,31,32,38].

Certains de ces acides aminés dicarboxyliques sont connus depuis plusieurs siècles, principalement en Asie, où ils sont utilisés comme vermifuges, insecticides ou épices alimentaires. L'attention des scientifiques s'est portée sur eux depuis la démonstration par Curtis et Watkins, en 1960, que l'application locale d'acide glutamique (GLU), qui demeure le prototype de cette série de molécules, induit l'activation des neurones de la moelle épinière[10]. Peu après, on sut que le GLU induit aussi des convulsions et une dégénérescence neuronale dans certaines régions du cerveau soit en application locale, soit en administration par voie générale.[1,8,35] On a vite constaté que ces propriétés excitatrice et neurotoxique du GLU sont aussi le fait de plusieurs autres molécules, dont le pouvoir excitateur est proportionnel à l'effet neurotoxique[8,11,12,25]. C'est sur cette base que le Dr Olney a proposé l'hypothèse excitotoxique, selon laquelle cette destruction neuronale serait induite par un taux d'excitation trop élevé[37,46]. Au cours des dernières années, de nombreux travaux ont été poursuivis sur les acides aminés excitateurs. En particulier, certaines données suggèrent que plusieurs d'entre eux agissent comme neurotransmetteurs ou neuromodulateurs dans le cerveau des mammifères[39,41,42,43] et que les effets de tous les acides aminés excitateurs s'exercent sur seulement trois types de récepteurs, dénommés d'après les substances exogènes présentant la plus haute affinité pour chacun d'entre eux: le KA, le quisqualate (QUIS) et le N-méthyl-D-aspartate (NMDA)[22,48].

Les résultats que nous présentons concernent plusieurs séries d'expériences réalisées afin de déterminer le substratum des effets du KA et de l'acide domoïque. Le KA est une substance particulièrement intéressante parce que: 1) de par sa structure, il ressemble beaucoup au GLU[6]; 2) il s'agit du plus puissant des acides aminés dicarboxyliques tant sur le plan de sa capacité à induire une excitation que sur celui de sa capacité à induire une neurodégénérescence[5,6,9,29,30,40,44]; 3) enfin, il offre un modèle simple pour vérifier l'hypothèse excitotoxique, puisqu'il a été bien démontré qu'il existe une différence de sensibilité très nette entre les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe dorsal, en ce qui concerne la dégénérescence neuronale qu'il induit[30,34,36].

Matériel et méthodes

Lésions à la colchicine

Des rats mâles Sprague-Dawley (225-300 g) anesthésiés par voie intra-péritonéale à l'hydrate de chloral (400 mg/kg) sont placés dans un appareil stéréotaxique. On pratique un trou de trépan à 4 mm antérieurement au lambda et à 2 mm de la ligne. La pointe d'une seringue de Hamilton de 5 µl est introduite dans la région du gyrus dentatus à 3,1 mm sous la surface du cortex. On injecte lentement, sur une période de 3 min., 3,5 ou 5 µg de colchicine dans 1 µl d'eau bi-distillée; c'est une toxine sélective pour grains du gyrus dentatus[23]. L'aiguille est ensuite

laissé en place durant 1 min afin d'éviter la remontée du liquide dans son trajet. Pendant les 48 h suivant la chirurgie, les animaux reçoivent, deux fois par jour, une injection intrapéritonéale de 1 ml de soluté physiologique glucosé à 5 %. On les soumet à un cycle lumière-obscurité de 12h-12 h; ils mangent et boivent à volonté. Les expériences électrophysiologiques seront réalisées de deux à trois semaines après la lésion.

Enregistrements électrophysiologiques

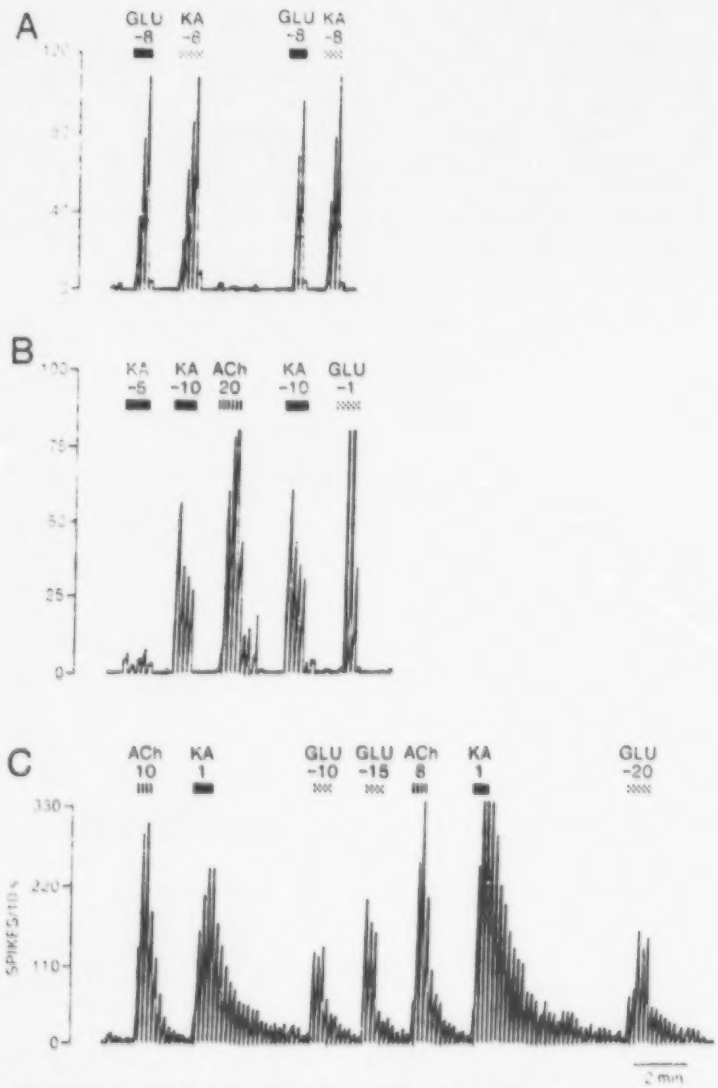
Les animaux anesthésiés à l'uréthane (1.25 g/kg en intra-péritonéale) sont placés dans un appareil stéréotaxique. Des micropipettes de verre à cinq canaux ont été préparées de la manière habituelle[24]. Le canal central rempli d'une solution de NaCl 2M saturée de Fast Green FCF sera utilisé pour les enregistrements unitaires. Un des canaux latéraux, rempli de solution de NaCl 2M, servira à équilibrer automatiquement les courants appliqués. Les trois autres canaux serviront à la micro-iontophonèse. Dans chaque série d'essais ils sont remplis de trois des solutions suivantes: acétylcholine (20mM dans NaCl 200 mM, pH 4), chlorediazépoxide (10 mM dans NaCl 20 mM, pH 4), chlocécystokinine-8-sulphate (10 µM dans NaCl 200 mM, pH 5), acide domoïque (100 µM ou 1 mM dans NaCl 400 mM, pH 8), dynorphine A 1-13 (500 µM dans NaCl 200mM, pH 5), flurazépam (50 mM dans 50 NaCl mM, pH 4), GLU.HCl (50 mM dans NaCl 50 mM, pH 8), iboténate (IBO; 10 mM dans NaCl 200 mM, pH 8), KA (100 µM ou 1mM dans NaCl 400 mM, pH 8), met-enképhaline (500 µM dans NaCl 200mM, pH 4), NMDA (50 mM dans NaCl 400 mM, pH 8), QUIS (1.5 mM dans NaCl 400 mM, pH 8).

La micropipette est placée à l'aide d'un micromanipulateur hydraulique dans la région CA1 ou CA3 de l'hippocampe. Les neurones pyramidaux de cette formation sont reconnus suivant les critères de Kandel et Spencer[26]: durée prolongée (0.8 à 1.5 ms) et amplitude élevée (0.5 à 2 mV) de leurs potentiels d'action, présence de décharges de pointes complexes. Le signal, amplifié et mis sur un oscilloscope de la manière habituelle, est traité sur un discriminateur d'amplitude différentielle donnant des impulsions carrées. Ces impulsions sont d'abord acheminées à un compteur traçant des histogrammes intégrés du taux de décharge, puis à un ordinateur IBM-PC via une interface Tecmar.

On ajuste l'intensité du courant d'éjection pour chacune des substances excitatrices de manière à obtenir un taux de décharge comparable et physiologique (10 à 20 Hz). Durant chaque application microiontophorétique d'une durée de 50 sec les intervalles de temps entre les potentiels d'action, la durée de l'application et l'intensité du courant sont gardés en mémoire afin de mesurer la réponse neuronale. Tous les

Figure 1
Histogrammes de fréquence intégrée obtenus à partir d'enregistrements unitaires de neurones du cortex pariétal (A), de la région CA_1 (B) et de la région CA_3 de l'hippocampe (C). Chaque pic vertical représente le nombre de potentiels d'action par 10 s.

Les barres horizontales indiquent la durée des applications microiontophorétiques pour lesquelles le courant est indiqué en nA.



KA: acide kaïnique; GLU: acide glutamique; ACh: acétylcholine

acides aminés excitateurs sont éjectés comme des anions, et les autres molécules comme des cations.

La réponse neuronale à l'application microiontophorétique des substances excitatrices se mesure en déterminant le degré d'activation, soit l'augmentation moyenne du nombre de potentiels d'action induits par nA de courant utilisé durant les 10 sec, soit le nombre total de potentiels d'action induits par nC [un nC (nanocoulomb) représentant la charge produite par un nanoampère pendant une seconde].

Vérifications histologiques

À la fin de l'expérience, on laisse un dépôt de Fast Green FCF en passant un courant de -25 µA durant 20 min dans le canal central. Les animaux sont ensuite sacrifiés; les cerveaux sont prélevés et congelés à -70°C. Les couples cryostatiques de 40 µm de la région de l'hippocampe sont doublement colorées au violet de crésyle et à la coloration de Timm[47] pour les métaux lourds, ce qui permet d'apprécier le degré de destruction induit par la colchicine et de vérifier l'emplacement précis du dernier site d'enregistrement.

Résultats et commentaires

Le premier but était de déterminer si la différence de sensibilité entre les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe dorsal à l'effet neurotoxique du KA est retrouvée pour son effet neuroexcitateur.

Dans la région CA1 de l'hippocampe, des courants de KA (1 mM) d'une intensité comprise entre -5 et -15 nA sont nécessaires pour induire l'activation des neurones pyramidaux (Fig. 1). Ces

Tableau 1.
Activation des neurones corticaux en CA1, et CA3 par le kaïnate, le glutamate et l'acétylcholine†

	Kaïnate		Glutamate		Acétylcholine	
	Courant†	Augmentation du taux de décharge	Courant	Augmentation du taux de décharge	Courant	Augmentation du taux de décharge
CA_3	0.2 ± 0.6	1104 ± 151*	-9 ± 1	1021 ± 176	13 ± 1	755 ± 108
	(43)‡		(43)		(34)	
CA_1	-25 ± 4	668 ± 260	-12 ± 2	1522 ± 360	13 ± 0.8	1535 ± 316
	(15)		(15)		(15)	
Cortex	-13 ± 4	1553 ± 605	-12 ± 2	2059 ± 694	13 ± 2	620 ± 157
	(9)		(9)		(9)	

†L'intensité des courants de iontophorèse est en nA ± é.t.
L'augmentation du taux de décharge durant les applications de 50s est exprimée en % ± é.t. du taux de décharge spontané
‡Le nombre de neurones testés est entre parenthèses
*P< 0.001, comparé avec les valeurs correspondantes en CA_1 et au cortex, par analyse de la covariance
é.t. = écart-type

Tableau 2.
Rapport de puissance d'action sur CA3/CA1

Acétylcholine	0,7
Cholécystokinine-8S	4,8
Dynorphine	1,7
met-Enképhaline	1,9
Glutamate	1,1
Iboténate	2,5
Quisqualate	1,6
Aspartate	1,8
Kaïnate	24,1
Acide domoïque	21,3

neurones sont aussi activés par des courants du même ordre de grandeur de GLU ou d'ACh, qui ont le même effet sur les neurones de la région CA3. Mais dans celle-ci, avec le KA, une diminution progressive du courant de rétention, permettant la «fuite» d'un petit nombre de molécules de KA, est suffisante pour obtenir une très importante activation du neurone (Fig. 1). Si on a recours à des courants d'éjection de KA d'une intensité plus élevée, l'activation apparaît très rapidement et persiste longtemps après la fin de l'application.

Dans le cortex cérébral, les neurones examinés répondent de manière comparable à ceux de la région CA1 (Fig. 1).

Les résultats de cette première série d'expériences, présentés dans le tableau 1, démontrent que, si l'on tient compte de l'intensité du courant utilisé, il existe une différence très importante quant au degré d'activation induit par le KA dans la région CA3 lorsqu'elle est comparée à celle obtenue dans la région CA1 ou dans le cortex. Mais pour les autres substances essayées (GLU et ACh) une telle différence n'est pas retrouvée. Enfin, pour aucune des substances (y compris le kaïnate), il n'y a de différence entre le CA1 et le cortex[19].

Il existe donc une différence de sensibilité très importante entre les neurones de la région CA1 et ceux de la région CA3, quant à leur réponse excitatrice au KA[19]. Afin de déterminer si cette différence de sensibilité est spécifique du KA, nous avons utilisé le même modèle pour tester un certain nombre de substances excitatrices, que ce soit des acides aminés excitateurs ou des neuropeptides qui, du fait de leur importante concentration dans cette région, pourraient faire office de ligand endogène pour le récepteur à KA.

Du fait de sa ressemblance structurale au KA, l'acide domoïque a été l'une des substances étudiées dans le cadre des comparaisons entre les régions CA1 et CA3. Dans la première, en raison des solutions très diluées de KA et d'acide domoïque (100 µM) utilisées dans cette série d'essais, des courants de l'ordre de -80 à -120 nA de KA ont été nécessaires pour obtenir une réponse, alors que des courants de -40 nA d'acide domoïque induisaient une activation à peu près semblable. Ceci indique que l'acide domoïque est encore plus puissant que le KA.

Dans la région CA3, avec ces solutions très diluées, il faut un courant d'éjection de -5 à -10 nA pour obtenir une activation par le KA; des courants identiques produisent une activation beaucoup plus importante avec l'acide domoïque (Fig. 2).

Les résultats obtenus dans cette série d'essais sont présentés dans la figure 3. Il n'existe pas, entre les régions CA1 et CA3, de différence significative de puissance pour les deux substances témoins (le NMDA et le QUIS) mais, comme dans la première série, le KA se montre environ 20 fois plus puissant dans la région CA3 que dans la région CA1. Ce même rapport s'obtient avec l'acide domoïque. De plus, il est intéressant de constater que, aussi bien dans la région CA1 que dans la région CA3, l'acide domoïque est environ trois fois plus puissant que le KA[16]. Ceci concorde parfaitement avec le fait que l'acide domoïque possède une affinité 3 à 4 fois plus élevée pour le site du [^{3}H]kaïnate que le KA lui-même[9,51].

Parmi les nombreuses substances testées à ce jour, nous constatons que,

Figure 2
Histogrammes de fréquence intégrée obtenus à partir d'enregistrements unitaires de neurones pyramidaux de la région CA3 après application iontophorétique, acide domoïque (DOM), quisqualate (QUIS) et N-méthyl-D-aspartate (NMDA)

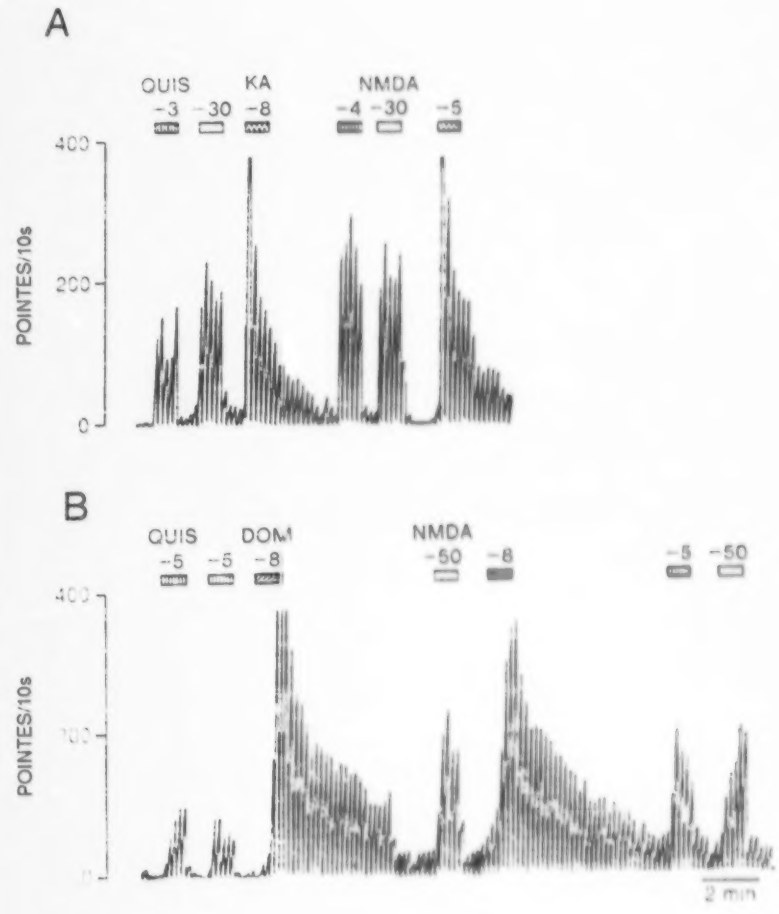
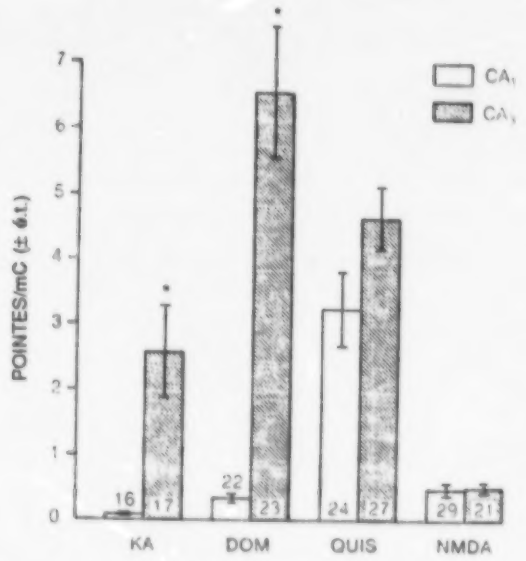
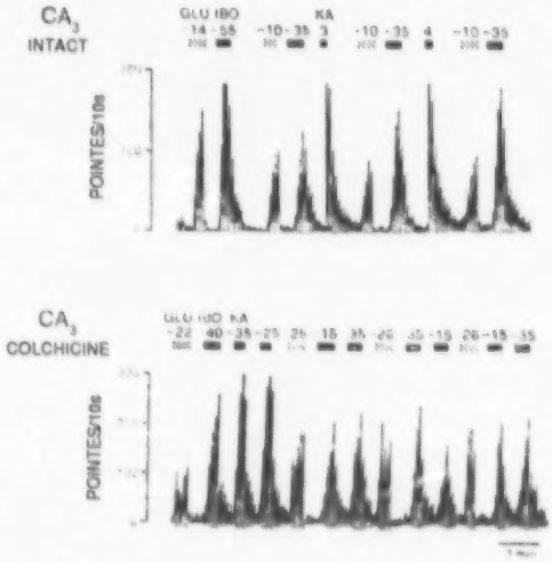


Figure 3
Degré d'activation (exprimé en nombre de potentiels d'action/nC ± é.t.) de neurones pyramidaux de la région CA1 et de la région CA3 induit par le KA, le DOM, le QUIS et le NMDA



*** p<0.001 pour la comparaison de ce degré dans les deux régions (test de *t* de Student bilatéral)**

Figure 4
Histogrammes de fréquence intégrée obtenus à partir d'enregistrements unitaires de neurones pyramidaux de la région CA3, KA et iboténate (IBO) du côté intact (A) et du côté lésé par une injection de colchicine (B)



mis à part le KA et l'acide domoïque, toutes induisaient un degré d'activation neuronale à peu près du même ordre de grandeur dans la région CA1 et dans la région CA3 (Tableau 2)[14,15,16,18,20]. Ces résultats font penser que l'acide domoïque agit via les récepteurs au kaïnate, dont il serait un agoniste encore plus puissant que le KA.

Dans un deuxième temps, il nous est apparu intéressant de déterminer si l'effet du KA est postsynaptique, c'est à dire si le KA active directement les neurones pyramidaux de la région CA3, ou au contraire, présynaptique, c'est à dire par la libération d'un autre neurotransmetteur. Dans la seconde hypothèse, le système des fibres moussues originaires du gyrus dentatus innervant sélectivement et de façon massive les neurones pyramidaux de la région CA3[7] apparait comme le support le plus probable de cet effet. Nous avons utilisé le même modèle expérimental pour comparer la réponse excitatrice au KA chez des rats intacts et des rats chez qui ce système de projections avait été détruit.

Cette lésion est effectuée unilatéralement en injectant, directement dans la région du gyrus dentatus, une dose de 3.5 à 5 µg de colchicine[23]. Environ trois semaines après l'injection on constate du côté lésé, après la coloration décrite plus haut, une disparition presque complète du gyrus dentatus et des terminaisons des fibres moussues, alors que les neurones pyramidaux de la région CA3 ne semblent pas touchés.

Dans la région CA1, que les neurones aient été activés par le GLU, l'IBO (un agoniste du récepteur NMDA)[33] ou par le KA, en utilisant des courants du même ordre du côté sain et du côté lésé, un degré d'activation à peu près identique est obtenu.

Dans la région CA3, du côté intact, il suffit simplement d'une diminution du courant de rétention de KA pour activer les neurones, alors qu'il faut des courants de GLU et d'IBO du même ordre que ceux utilisés dans la région CA1 pour activer les mêmes neurones. Mais du côté lésé par la colchicine, il faut des courants d'éjection de KA beaucoup plus élevés (de l'ordre de -25 à -35 nA) pour obtenir le même résultat (Fig. 4).

Tels que présentés dans la figure 5, les résultats de cette série d'expériences

démontrent que, dans la région CA1, il n'existe pas de différence significative entre les réponses obtenues du côté intact et du côté lésé, et ce, quelle que soit la substance étudiée. Mais dans la région CA3 il existe une diminution très importante (de l'ordre de 90%) de la réponse au KA, alors qu'il n'existe pas de différence significative pour les réponses au GLU et à l'IBO[15,20].

Afin de confirmer que l'acide domoïque agit bien via les récepteurs de KA, on suit le même protocole. Comme pour le KA, la lésion du gyrus dentatus entraîne une diminution très importante du nombre de potentiels d'action par nC en présence d'acide domoïque, alors que les réponses obtenues avec le NMDA et le QUIS sont à peu près inchangées (Debonnel, Weiss et de Montigny, observations non publiées).

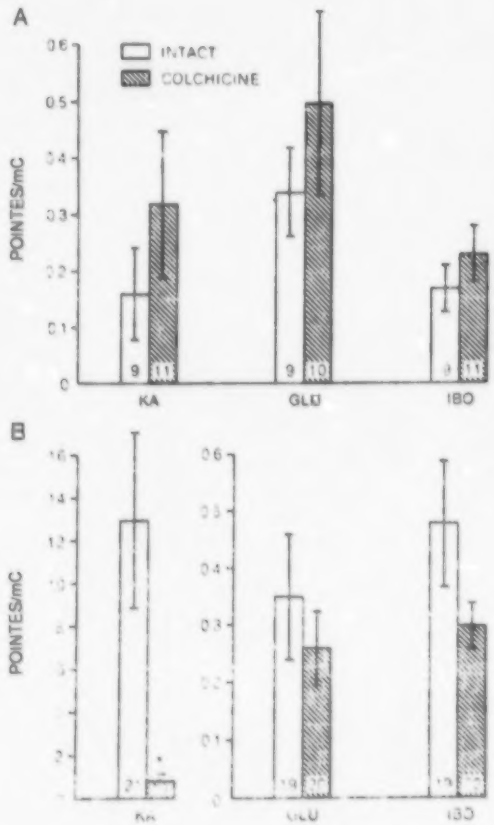
Ces deux séries de résultats suggèrent donc premièrement que l'acide domoïque produit bien son effet neuroexcitateur, et donc présumément son effet neurotoxique, par l'activation des récepteurs au KA, et deuxièmement que leur site d'action est présynaptique, puisqu'une lésion du gyrus dentatus induit une diminution importante du degré d'activation induit par le KA et l'acide domoïque dans la région CA3. Cette dernière observation démontre que l'extrême sensibilité des neurones de la région CA3 à ces substances n'est présente que lorsque le système des fibres moussues est intact. L'activation d'un récepteur présynaptique sur les terminaisons des fibres moussues induirait la libération d'un neurotransmetteur excitateur des neurones pyramidaux de la région CA3. Ce point est particulièrement important dans la mesure où, comme l'a démontré le suivi des patients intoxiqués par les moules de l'Île-du-Prince-Édouard, ceux-ci ont présenté des symptômes neurologiques ou neuropsychologiques (convulsions, amnésie) évoquant une lésion hippocampique. De plus, chez deux patients décédés des suites de cette intoxication, l'examen anatomo-pathologique a effectivement révélé une perte neuronale massive dans l'hippocampe, beaucoup plus marquée dans la région H3 que dans la région H1, correspondant respectivement aux régions CA3 et CA1 du rat [17], Teitelbaum J, Zatorre R, Carpenter S et coll. observations non publiées).

Nous sommes donc en présence de deux inconnues: d'une part le ligand endogène du KA, d'autre part le neurotransmetteur qui est libéré par les fibres moussues.

Dans l'attente de l'identification de ces deux facteurs endogènes, qui pourrait avoir des répercussions cliniques importantes, nous avons tenté de trouver un atagoniste sélectif du KA, c'est à dire une substance qui pourrait bloquer sélectivement ses effets neuroexcitateur et neurotoxique.

Dans la région CA1, nous avons activé les neurones pyramidaux avec du KA, du GLU et de l'ACh. L'administration intraveineuse de neuroleptiques, chlorpromazine (4 mg/kg) et halopéridol (2 mg/kg), n'a presque pas d'effet sur l'activation par le KA, mais a quelque peu réduit l'activation induite par le GLU. Le phénobarbital, injecté par la même voie (10 mg/kg) augmente légèrement l'effet du KA. Mais l'injection intraveineuse de lorazépam (0.5 mg/kg) (Fig. 6) ou de diazépam (1 mg/kg) induit une suppression presque complète de l'activation par le KA, alors qu'elle n'a

Figure 5
Degré d'activation (exprimé en nombre de potentiels d'action /nC ± é.t.) de neurones pyramidaux de la région CA1 (A), et de la région CA3 (B) induit par le KA, le GLU et l'IBO, du côté intact et du côté lésé



*** p<0.001 pour la comparaison des deux côtés (test de *t* de Student bilatéral)**

Figure 6
Histogramme de fréquence intégrée, obtenu à partir d'enregistrements unitaires d'un neurone pyramidal de la région CA1 activé par le KA. La flèche indique le moment de l'injection de lorazépam

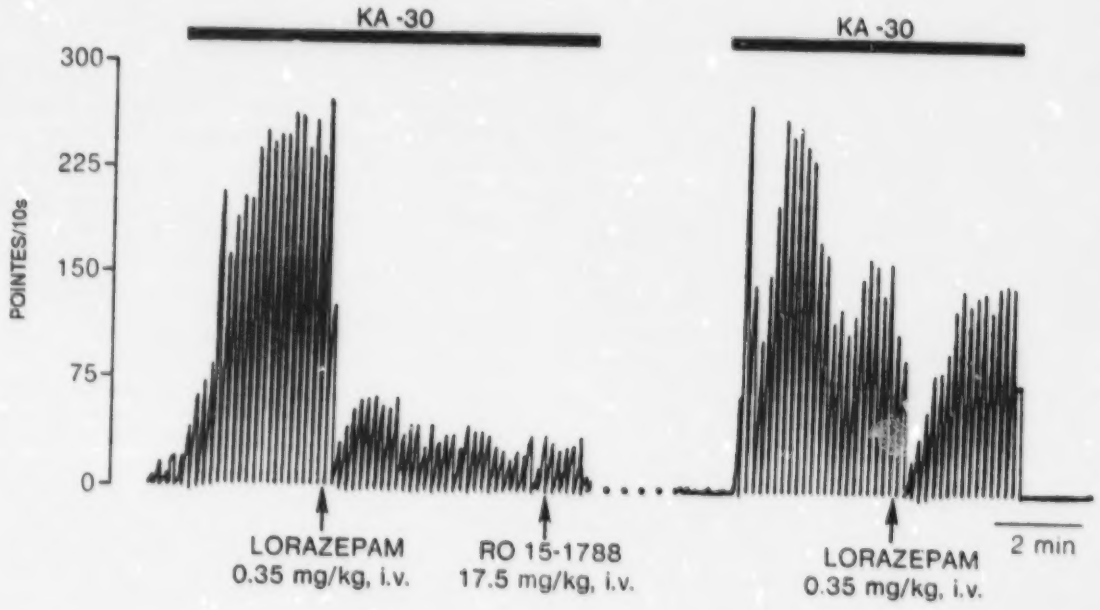
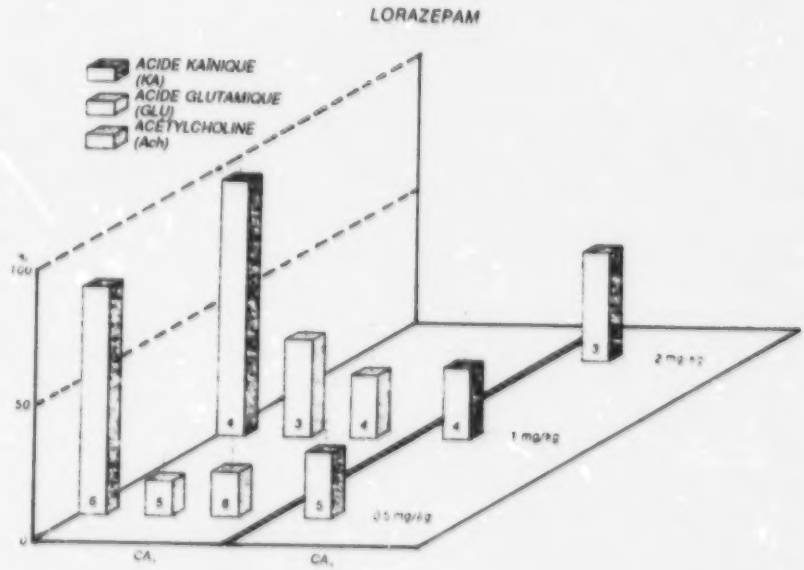


Figure 7
Degré de suppression* (% ± é.t.) par le lorazépam de l'activation induite par le KA, le GLU, et l'ACh de neurones de la région CA1 et de la région CA3, en fonction des doses administrées par voie intraveineuse



* Le degré de suppression est mesuré en comparant le nombre de potentiels d'action déclenchés par chacune des substances excitatrices avant et 3 min après l'injection de lorazépam

que très peu d'effet sur les activations induites par le GLU ou l'ACh (Fig. 7).

Des résultats semblables obtenus lorsque le flurazépam ou le chlordiazépoxide est appliqué directement par microiontophorèse à faibles courants (2 à 10 nA) sur les neurones de la région CA1 activés par le KA et l'ACh.

Dans la région CA3, cependant, les benzodiazépines affectaient beaucoup moins l'activation induite par le KA. En effet, il a fallu utiliser des courants de flurazépam ou de chlordiazépoxide beaucoup plus importants (de l'ordre de 40 à 100 nA) pour en obtenir une suppression significative. On obtient les mêmes résultats par l'injection intraveineuse de lorazépam: alors qu'une dose de 0.5 mg/kg suffisait à diminuer de 90% l'effet du KA dans la région CA1, il faut une dose cumulative de 2 mg/kg pour obtenir une suppression d'environ 50% de cet effet (Fig. 7)[15].

Un autre point intéressant: cette suppression de l'effet du KA par le lorazépam est elle-même renversée par l'injection de flumazénil (RO 151788), un antagoniste spécifique des benzodiazépines (Fig. 6), ce qui laisse croire que cet effet des benzodiazépines s'exerce bien sur leurs récepteurs spécifiques et n'est pas un effet de type compétitif sur le récepteur de KA[18].

En somme, parmi les différentes classes d'agents pharmacologiques essayées comme antagonistes du KA, seules les benzodiazépines ont été capables d'induire une suppression sélective et effective de l'activité du KA, avec un effet beaucoup plus marqué dans la région CA1 que dans la région CA3.

Ces résultats sont corroborés par l'observation clinique des patients intoxiqués par l'acide domoïque qui ont présenté des convulsions, et qui ont été améliorés par des doses élevées de benzodiazépines, qu'il s'agisse de diazépam ou de lorazépam, alors que le phénobarbital et la diphénylhydantoïne se sont avérés inefficaces.

Conclusions

Nos travaux électrophysiologiques donnent à penser que l'acide domoïque produit son effet neurotoxique en agissant comme un agoniste remarquablement puissant du récepteur du KA, et que, dans la région CA3, cet effet est du à une action présynaptique sur les terminaisons des fibres moussues. Dans l'éventualité malheureuse d'une nouvelle vague d'intoxications humaines, nos résultats font croire qu'un traitement par de hautes doses de benzodiazépines préviendrait des lésions importantes et irréversibles de l'hippocampe. Cependant, il nous apparaît de la plus haute importance que de nouvelles expériences soient entreprises afin d'identifier les neurotransmetteurs impliqués dans ce processus. Une telle découverte permettrait vraisemblablement de synthétiser un antagoniste plus sélectif et plus puissant du récepteur de KA. Un tel antagoniste serait un agent thérapeutique efficace non seulement pour le traitement des symptômes de l'intoxication à l'aide domoïque, mais surtout pour la prévention des lésions neuronales irréversibles.

Remerciements

Nous aimerions remercier M. Boulay pour son aide dans le domaine de l'électronique, L. Caillé pour la programmation des ordinateurs et les analyses statistiques, H. Cameron pour le secrétariat, G. Filosi pour les illustrations et L. Stroll pour son aide technique. Travail subventionné en partie par le Conseil Canadien de la Recherche Médicale, fonds MT-6444 à C. de M.

Références

1. Arees EA, Mayer J. *Monosodium glutamate-induced brain lesions: Electron microscopy examination*. Science 1970; 170: 549-550.
2. Beaumont K, Maurin Y, Reisine TD, et coll. *Huntington's disease and its animal model: alterations in kainic acid binding*. Life Sci 1979; 24: 809-816.
3. Ben-Ari Y, Lagowska J, Tremblay E, Le Gal La Salle G. *A new model of focal status epilepticus: intra-amygloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures*. Brain Res 1980; 163: 176-179.
4. Bhagavan HN, Coursin DB, Stewart CN. *Monosodium glutamate induced convulsive disorders in the rat*. Nature 1971; 232: 275-277.
5. Biscoe TJ, Evans RH, Headley MR, Martins MR, Watkins JC. *Domoic and quisqualic acids as potent amino acid excitant of frog and rat spinal neurones*. Nature 1975; 255: 166-167.
6. Biscoe TJ, Evans RH, Headley MR, Martins MR, Watkins JC. *Structure-activity relations of excitatory amino acids on frog and rat spinal neurones*. Br J Pharmacol 1976; 58: 373-382.
7. Blackstad TW, Brink K, Hem J, Jene B. *Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat: an experimental study with silver impregnation methods*. J Comp Neurol 1970; 138. 433-450.
8. Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. *Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus*. J Physiol 1983; 334: 33-46.
9. Coyle JT, Ferkany JW, Zaczek R. *Kainic acid: Insights from a neurotoxin into the pathophysiology of Huntington disease*. Neurobehav Toxicol Teratol 1983; 5: 617-624.
10. Curtis DR, Watkins JC. *The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino-acids*. J Neurochem 1960; 6: 117-141.
11. Curtis DR, Watkins JC. *Acidic amino-acids with strong excitatory actions on mammalian neurones*. J Physiol 1963; 166: 1-14.
12. Curtis DR, Duggan AW, Felix D, Johnston GAR, Tebecis AK, Watkins JC. *Excitation of mammalian central neurones by acidic amino acids*. Brain Res 1972; 41: 283-301.
13. Debonnel G, de Montigny C. *Benzodiazepines selectively antagonize kainate-induced activation in the rat hippocampus*. Eur J Pharmacol 1983; 93: 45-54.
14. Debonnel G, de Montigny C. *Hippocampal mossy fiber denervation induces a supersensitivity to cholecystokinin in the guinea pig but not in the rat*. Neurosci Abst 1987; 13: 402-7.

15. Debonnel G, de Montigny C. *Increased neuronal responsiveness to cholecystokinin and dopamine induced by lesioning mesolimbic dopaminergic neurons: an electrophysiological study in the rat*. Synapse 1988; 2: 537-545.

16. Debonnel G, Beauchesne L, de Montigny C. *Domoic acid, the alleged "mussel toxin," might produce its neurotoxic effect through kainate receptor activation: an electrophysiological study in the rat dorsal hippocampus*. Can J Physiol Pharmacol 1989; 67: 29-33.

17. Debonnel G, Teitelbaum J, Carpenter S, Beauchesne L, Antel J, de Montigny C. *The "mussel toxin," domoic acid produces its neurotoxic effect through kainate receptor: clinical and electrophysiological studies*. Neurosci Abst 1988; 14: 98.15.

18. de Montigny C, Debonnel G, Tardif D. *Electrophysiological and pharmacological studies on kainic acid-induced neuronal activation*. Wenner-Gren Intern Symp Ser 1983; 39: 157-169.

19. de Montigny C, Tardif D. *Differential excitatory effects of kainic acid on CA3 and CA1 hippocampal pyramidal neurons: further evidence for the excitoxic hypothesis and for a receptor-mediated action*. Life Sci 1981; 29: 2103-2110.

20. de Montigny C, Weiss M, Ouellette J. *Reduced excitatory effect of kainic on rat CA3 hippocampal pyramidal neurons following destruction of the mossy projection with colchicine*. Exp Brain Res 1987; 65: 605-613.

21. Etienne P, Baudry M. *Calcium dependant aspects of synaptic plasticity: Excitatory amino acid neurotransmission, brain aging and schizophrenia: an unifying hypothesis*. Neurobiol Aging 1987; 8: 362-366.

22. Foster AC, Fagg GE. *Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: Their characteristics and relationship to synaptic receptors*. Brain Res Rev 1984; 7: 103-164.

23. Goldschmidt RB, Stewart O. *Preferential neurotoxicity of colchicine for granule cells of the dentate gyrus of the adult rat*. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 3047-3051.

24. Haigler HJ, Aghajanian GK. *Lysergic acid diethylamide and serotonin: A comparison of effects on serotonergic neurons receiving a serotonergic input*. J Pharm Exp Ther 1974; 168: 688-699.

25. Johnston GAR, Curtis DR, Davies J, McCulloch RM. *Spinal interneurone excitation by conformationnally restricted analogues of L-glutamic acid*. Nature 1974; 248: 804-805.

26. Kandel ER, Spencer NA. *Electrophysiology of hippocampal neurons. II. After-potentials and repetitive firing*. J Neurophysiol 1961; 24: 243-259.

27. Kim JS, Claus D, Kornhuber HH. *Cerebral glutamate, neuroleptic drugs and schizophrenia: increase of cerebrospinal fluid glutamate levels and decrease of striate body glutamate levels following sulpiride treatment in rats*. Eur J Neurol 1983; 22 367-370.

28. Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmuller B. *Low cerebrospinal fluid in schizophrenic patients and a new hypothesis for schizophrenia*. Neurosci Lett 1980; 20: 379-382.

29. Kizer JS, Nemeroff CB, Youngblood WM. *Neurotoxic amono acids and structurally related analogs*. Pharmacol Rev 1978; 29: 301-318.

30. Köhler C, Schwarcz R. *Comparison of ibotenate and kainate neurotoxicity in rat brain: a histological study*. Neuroscience 1983; 8: 819-835.

31. Kornhuber J, Fischer EG. *Glutamic acid diethyl ester induces catalepsy in rats. A new model for schizophrenia?* Neurosci Lett 1982; 34: 325-329.

32. Lothman EW, Collins RC, Ferrendelli JA. *Kainic acid induced limbic seizures: electrophysiologic studies*. Neurology 1981; 31: 806-812.

33. McLennan H, Lodge D. *The antagonism of amino acid-induced excitation of spinal neurones in the cat*. Brain Res 1979; 69: 83-90.

34. Nadler JV, Perry BW, Coleman CW. *Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells*. Nature 1978; 271: 676-677.

35. Olney JW. *Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate*. Science 1969; 164: 719-721.

36. Olney JW, Fuller T, De Gubareff T. *Acute dendrotoxic changes in the dorsal hippocampus of kainate treated rats*. Brain Res 1979; 176: 91-100.

37. Olney JW, Ho OL, Rhee V. *Cytotoxic effects of acidic and sulphur containning amino acids on the infant mouse central nervous system*. Exp Brain Res 1971; 14: 61-76.

38. Olney JW, Price MT, Labruyere J, et coll. *Anti-parkinsonian agents are phencyclidine agonists and N-methyl-aspartate antagonists*. Eur J Pharmacol 1987; 142: 319-320.

39. Olney JW, Price MT, Salles KS, et coll. *L-Homocysteic acid: An endogenous excitoxic ligand of the NMDA receptor*. Brain Res Bull 1987; 19: 597-602.

40. Olney JW, Rhee V, Ho OL. *Kainic acid: A powerful neurotoxic analogue of glutamate*. Brain Res 1974; 77: 507-512.

41. QuangDo K, Herrling PL, Streit P, Turski PA, Cuenod M. *In vitro release and electrophysiological effects in situ of homocysteic acid, an endogenous N-methyl-DL-aspartic acid agonist in the mammalian brain*. J Neurosci 1986; 6: 2226-2234.

42. QuangDo K, Mattenberg M, Streit P, Cuenod M. *In vitro release of endogenous excitatory sulfur containing acids from various rat brain regions*. J Neurochem 1986; 46: 779-786.

43. Sawada S, Takada S, Yamamoto C. *Excitatory actions of homocysteic acid on hippocampal neurons*. Brain Res 1982; 238: 282-285.

44. Schwarcz R, Scholz D, Coyle JT. *Structure activity relations for the neurotoxicity of kainic acid derivatives and glutamate analogues*. Neuropharmacology 1978; 17: 145-151.

45. Shinozaki H. *Discovery of novel actions of kainic acid and related compounds*. Dans: *Kainic acid as a tool in neurobiology*. McGeer EG, Olney JW, McGeer PL, éds. New York: Raven Press, 1978; 17-35.

46. Sloviter RS, Damiano BP. *On the relationship between kainic acid-induced epileptiform activity and hippocampal neuronal damage*. Neuropharmacology 1981; 20: 1003-1011.

47. Timm F. *Zur Histochemie des Ammonshorngebietes*. Z Zellforrsch 1958; 48: 458-555.

48. Watkins JC, Evans RH. *Excitatory amino acid transmitters*. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1981; 21: 165-204.

49. Wright JLC, Boyd RK, de Freitas ASW, et coll. *Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island*. Can J Chem 1989; 67: 481-490.

50. Wuerthele SM, Lovell KL, Jones MA, Moore KE. *A histological study of kainic acid-induced lesions in the rat brain*. Brain Res 1978; 149: 489-497.

51. Zaczek R, Coyle JT. *Excitatory amino acid analogues: Neurotoxicity and seizures*. Neuropharmacology 1982; 21: 15-26.

Discussion

J. MacDonald, Toronto : Je suis curieux : Telkburg en Israël, Suwana au Japon et nous-mêmes avons montré que les barbituriques peuvent bloquer de manière sélective les canaux de l'acide kaïnique et je suis curieux de savoir comment vous expliquez cette situation. Par exemple, Suwana l'a démontré dans la région CA1 de l'hippocampe et il semble que ces résultats soient tout à fait différents des vôtres.

G. Debonnel : S'agissait-il du même modèle ou s'agissait-il d'un modèle neurodégénératif?

J. MacDonald : Dans l'hippocampe.

G. Debonnel : Oui, mais s'agissait-il d'un modèle électrophysiologique?

J. MacDonald : Oui, l'hippocampe. Telkburg dans un dosage d'afflux et nous dans une culture tissulaire de la masse de l'hippocampe.

G. Debonnel : Dans une culture de tissus.

J. MacDonald : Oui. Il s'agissait fondamentalement de cellules isolées à partir de coupes de l'hippocampe, semblables à celles que vous avez utilisées, et de cellules en culture.

G. Debonnel : Eh bien, je pense que nous avons eu les mêmes observations sur certains de ces résultats à la *Society for Neurological Science* et je crois que tous ceux qui ont fait une présentation ont obtenu le même résultat que nous. Ainsi, il semble qu'il y ait une différence nette entre les résultats que l'on peut obtenir avec des coupes et les résultats que l'on obtient chez des animaux intacts, du moins, pour ce qui est de cette région.

J. MacDonald : Ainsi, vous pensez que le canal a changé *in vivo*. Il n'est plus le même?

G. Debonnel : Non, je ne crois pas que ce canal ait changé, mais je pense qu'un autre mécanisme pourrait intervenir dans ce processus et qui aurait pour effet de modifier les résultats.

J. MacDonald : Il se pourrait q'on observe un effet très indirect.

G. Debonnel : Cela se pourrait. Nous savons simplement que nous avons mis la substance dans le voisinage du neurone. Mais nous n'avons jamais affirmé que nous avions un effet direct sur ce neurone cible, à ce niveau.

J. MacDonald : Je me demande si vous avez tenu compte des changements touchant la géométrie de la cellule. Si la région CA3 reçoit un influx fortement excitateur et qu'elle utilise postsynaptiquement des récepteurs de l'acide kaïnique, après que vous avez provoqué une dégénérescence des influx, il a pu y avoir redistribution de ces récepteurs. En d'autres mots, la concentration élevée des récepteurs dans le soma peut disparaître. Ainsi, même si vous avez une densité élevée dans le soma de CA3 là où vous étiez en train d'enregistrer, postsynaptiquement, avec des électrodes extracellulaires, après la dégénérescence ces récepteurs ne sont plus infrasynaptiques, et, par conséquent, comme c'est le cas de beaucoup d'autres systèmes, ils ont tendance à ne pas se maintenir à cette densité, ou à se déplacer ailleurs sur la membrane cellulaire. Par conséquent, ils finissent par avoir l'air de CA1, sans qu'il soit nécessaire d'avoir un récepteur présynaptique.

G. Debonnel : Oui, cela pourrait être une solution, mais à ce moment-là, nous nous attendions à obtenir une relation temps-réponse. Or nous avons fait au moins quatre ou cinq séries d'expériences avec ce genre de lésion en cultures âgées de cinq jours à environ cinq semaines. Il semble qu'après cinq ou six jours, lorsque la lésion est en plein développement, l'effet est complètement différent de ce qu'on voit du côté intact et du côté témoin. Nous n'avons pas eu l'impression qu'il y eût une relation de temps entre le moment où la réponse à l'acide kaïnique ou à l'acide domoïque a commencé à diminuer et le moment de l'injection.

J. Olney : En ce qui concerne les barbituriques, nous avons étudié leur capacité de protéger la rétine du poussin contre la toxicité de l'acide kaïnique; dans cette préparation, certains barbituriques assurent une protection, d'autres non, et le type de barbituriques que l'on utilise peut faire une grosse différence. Par exemple, le phénobarbital n'a pas une action protectrice très puissante et je crois que Telkburg a constaté que parmi les barbituriques qu'il a essayés, le plus puissant était le sécobarbital. Nous avons constaté que le sécobarbital est relativement puissant, mais nous avons ensuite étudié certains thiobarbituriques, à savoir le thiamylol et le thiopental, pour nous rendre compte qu'ils étaient encore plus puissants que le sécobarbital. Ainsi, selon le barbiturique que vous étudiez, vous pouvez obtenir, du moins dans le cas de la rétine de poussin, un bon effet protecteur ou pas d'effet du tout.

C. Pinsky : D[r] Debonnel, laissez-moi d'abord vous dire combien j'ai apprécié votre excellente présentation du travail minutieux et très complet que vous avez effectué en collaboration avec le D[r] de Montigny. J'aurais une ou deux questions pour vous. Avez-vous vérifié l'interaction entre les divers antagonistes de l'acide domoïque en ce qui concerne l'activité des neurones?

G. Debonnel : Pas encore. Nous travaillons à l'heure actuelle très fort sur les récepteurs de NMDA, mais nous n'avons jamais encore essayé jusqu'à présent d'étudier l'interaction entre le MK21 et l'acide domoïque. Mais vu les résultats du MK21 et de l'acide kaïnique, je ne crois pas qu'on y trouverait une interaction importante.

C. Pinsky : Ma deuxième question est la suivante. Avez-vous bien dit que vous pensiez qu'il serait souhaitable que l'on trouve des antagonistes plus spécifiques de manière que l'on puisse envisager un traitement s'il survenait une autre poussée d'intoxication par l'acide domoïque?

G. Debonnel : Oui, je crois que ce serait certainement une bonne chose que d'avoir des antagonistes sélectifs pour chacun des trois types de récepteurs, de toute évidence, pour des raisons liées à la recherche, mais également d'un point de vue clinique; je crois que le fait d'avoir un antagoniste très sélectif pour les récepteurs de l'acide kaïnique ou de l'acide domoïque nous permettrait, si la spécifité et l'innocuité du produit sont démontrées, d'avoir un traitement beaucoup plus intéressant que le benzodiazépam, parce que des calculs très sommaires nous indiquent qu'il faudrait utiliser environ 200 mg de benzodiazépine chez un malade pour obtenir de bons résultats contre les convulsions provoquées par l'acide domoïque.

C. Pinsky : Mais si l'on regarde les données que vous avez présentées et votre résumé, il existe de nombreux récepteurs, et non seulement des récepteurs, mais des régions différentes, présynaptiques et postsynaptiques, qui sont touchées dans le syndrome global. Ne croyez-vous pas qu'il serait souhaitable d'avoir un antagoniste non spécifique à large spectre d'action?

G. Debonnel : Eh bien, je crois que si vous avez un antagoniste agissant contre l'un et l'autre de ces deux récepteurs, vous parviendrez à bloquer l'effet de toute manière. Ainsi, dès que vous en avez un, tant mieux. Mais si nous pouvions trouver les deux antagonistes, ce serait encore beaucoup plus intéressant.

C. Pinsky : Je voulais simplement savoir ce que vous pensez de l'acide domoïque qui, bien sûr, est quelque peu différent de l'acide kaïnique par son action sur différents récepteurs, mais qui en même temps présente de grandes ressemblances.

14. Caractérisation moléculaire d'un récepteur supposé de l'acide kaïnique

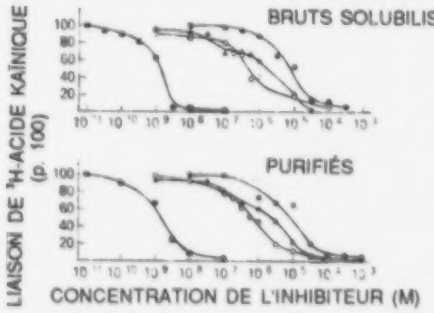
D.R. Hampson, C.J. Dechesne et R.J. Wenthold

Résumé

Nous avons réalisé la purification d'un récepteur supposé de l'acide kaïnique par la mise au point d'une colonne d'affinité pour l'acide domoïque. Immobilisé par ses groupements acides carboxyliques, celui-ci conserve la capacité de lier les récepteurs de l'acide kaïnique en solution. Le récepteur purifié provenant du cerveau de grenouille migre sous forme de bande diffuse centrée sur un poids moléculaire relatif de 48 000 en gel de polyacrylamide.

Figure 1

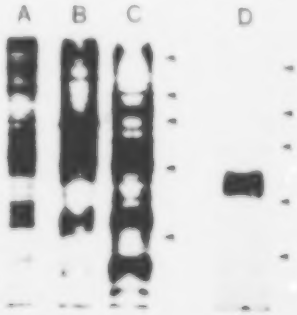
Profils de compétition pour les préparations de RAK bruts solubilisés et purifiés. Ces essais de liaison emploient 5nM de [^{3}H]AK. Les aliquotes de ces préparations sont pré-incubées pendant 10 minutes avec 6 à 10 concentrations d'inhibiteur avant l'essai.



■ acide domoïque; o acide quisqualique; ▲ acide glutamique; ◦ acide dihydrokaïnique (reproduit de Hampson et Wenthold, 1988, avec l'autorisation du «Journal of Biological Chemistry»).

Figure 2

Électrophorèse en gel de polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium. (A) préparation brute solubilisée de cerveau de grenouille (10 µg de protéine); (B) mélange de fractions de la colonne de DEAE-sépharose CL-6B (2,5 µg de protéine); (C) fractions non retenues après préparation du RAK purifié (1 µg de protéine); (D) RAK purifié (1 µg de protéine). Le gel a été coloré au nitrate d'argent.



Les marqueurs indiquent les étalons: myosine, M_r = 205 000; phosphorylase b, M_r = 97 400; sérumalbumine bovine, M_r = 67 000; ovalbumine, M_r = 44 000; anydrase carbonique, M_r = 29 000 (reproduit à partir de Hampson et Wenthold, 1988, avec l'autorisation du «Journal of Biological Chemistry»).

La disponibilité de cette préparation a permis de poursuivre la caractérisation moléculaire d'un récepteur de l'acide kaïnique par la production d'anticorps anti-récepteurs monoclonaux et polyclonaux. Les anticorps monoclonaux qui à la fois entraînent l'immuno-précipitation de l'activité de liaison de l'acide kaïnique tritié (^{3}H) et marquent la bande M_r = 48 000 sur les Western blots sont une forte preuve que cette bande correspond bien à la sous-unité de liaison d'un récepteur de l'acide kaïnique dans le cerveau de grenouille. L'utilisation de ces anticorps dans les études immunocytochimiques a montré que l'immunoréactivité des récepteurs de l'acide kaïnique est en majeure partie concentrée aux sites extrasynaptiques des membranes neuronales.

Les récepteurs des aminoacides neurotransmetteurs excitateurs, notamment des acides glutamique et aspartique, consistent en une population hétérogène de molécules. À partir d'études pharmacologiques et physiologiques, au moins trois types de récepteurs ont été identifiés: ceux du N-méthyl-D-aspartate (NMDA), du quisqualate et de l'acide kaïnique[1,2]. On pense, sur la foi d'un certain nombre de travaux, que l'acide domoïque exerce ses effets neuroexcitateurs et neurotoxiques sur le système nerveux central (S.N.C.) par le biais des récepteurs de l'acide kaïnique RAK[3,4].

La caractérisation moléculaire des récepteurs d'aminoacides excitateurs a progressé assez lentement. Plusieurs facteurs, dont l'absence de méthodes pour leur purification, ont contribué à cette lenteur. En 1987, nous avons mis au point une méthode de purification d'un RAK à partir du cerveau de grenouille, utilisé comme source de tissu en raison de la forte concentration de RAK dans le S.N.C. des amphibiens, et parce que les propriétés pharmacologiques de ces récepteurs dans le cerveau de *Rana pipiens* sont semblables

à celles observées dans le S.N.C. des mammifères[5,6,7].

L'utilisation de la chromatographie d'affinité pour l'acide domoïque constitue une étape clé du processus de purification des RAK. Couplé de façon covalente à l'amino-sépharose par le biais de ses groupements carboxyliques, l'acide domoïque conserve la capacité de lier les RAK en solution. Après lavage abondant de la colonne à l'aide d'un tampon fortement salin, les récepteurs sont extraits par élution de façon biospécifique au moyen de l'acide kaïnique. Après dialyse, le récepteur ainsi hautement purifié montre le même profil pharmacologique que le RAK solubilisé non purifié (figure 1). Lorsqu'il est soumis à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium, le récepteur purifié migre sous forme de bande diffuse centrée sur un poids moléculaire relatif M_r = 48 000 (figure 2). Ce poids est du même ordre que celui de sous-unités de plusieurs autres récepteurs de canaux ioniques, tels ceux du glycocolle[8], de l'acide gamma-aminobutyrique[9], et du récepteur nicotinique l'acétylcholine[10].

Les RAK du cerveau de grenouille et de rat semblent être glycosylés, vu leur liaison avec les lectines conjuguées au sépharose[6,7,11]. Nous étudions actuellement l'importance et la nature de ces substitutions oligosaccharidiques. Les premiers résultats indiquent que les hydrates de carbone constituent environ 10 p. 100 du poids moléculaire du RAK dans le cerveau de grenouille. La fonction de la chaîne secondaire oligosaccharidique reste inconnue. Mais on a montré récemment que la lectine concanavaline A inhibe la désensibilisation du récepteur d'un aminoacide excitateur apparenté, le quisqualate[12].

On effectue actuellement une caractérisation plus poussée du RAK en utilisant des anticorps monoclonaux et polyclonaux. On a obtenu ces anticorps en immunisant des souris ou des lapins au RAK du cerveau de grenouille purifié par affinité[13]. Ces anticorps sont utilisés dans diverses expériences portant notamment sur la localisation immunocytochimique en microscopie optique et ultrastructurale, la purification par immuno-affinité des récepteurs d'AK et des molécules apparentées, l'immunoprécipitation et la recherche dans les banques d'expression d'ADN complémentaire (c). Le fait que la protéine de M_r = 48 000 purifiée à partir du cerveau de grenouille par la chromatographie d'affinité pour l'acide domoïque est bien une sous-unité de liaison du RAK a été confirmé par les expériences d'immunoprécipitation et le Western blot. En effet, plusieurs anticorps anti-RAK monoclonaux qui déterminent l'immunoprécipitation de l'acide ^{3}H-kaïnique solubilisé ont également marqué une protéine de M_r = 48 000 au Western blot[13]. Les études immunocytochimiques et autoradiographiques confirment également que les anticorps reconnaissent le principal RAK sur les coupes de cerveau de grenouille. Les résultats de ces expériences montrent, d'une part que les RAK sont largement distribués à travers le système nerveux central de la grenouille, dont certaines régions en montrent de très fortes concentrations, et d'autre part que la répartition de la coloration des anticorps correspond à celle des sites de liaison de l'acide ^{3}H-kaïnique[14]. On a également utilisé des anticorps monoclonaux pour reconnaître les RAK dans le S.N.C. du poulet[15] et du pigeon[16]. Chez les deux espèces, ces protéines ont un poids moléculaire très voisin (49 000 - 50 000) de celui de la sous-unité de liaison (M_r = 48 000) que nous avons purifiée à partir du cerveau de grenouille.

La microscopie électronique a révélé une répartition ultrastructurale complexe des RAK dans le cerveau de grenouille[14]. Dans le toit optique, l'immunocoloration des neurones se voit surtout en dehors des sites synaptiques. Il s'en trouve un peu aux sites post-synaptiques. La majeure partie de l'immunocoloration apparente à la microscopie optique est due à la coloration de sites extra-synaptiques. Ces constatations suggèrent que la même molécule peut servir à différentes fonctions physiologiques à ces deux sortes de sites. On tentera de déterminer par des études ultérieures s'il existe une semblable répartition intracellulaire des RAK dans le S.N.C. des mammifères.

Bien que les anticorps anti-RAK suscités à cette protéine du cerveau de grenouille ne semblent pas reconnaître les RAK solubilisés à partir du cerveau de rat (par immunoprécipitation), plusieurs de ces anticorps marquent effectivement les protéines du cerveau de rat au Western blot. L'un d'entre eux y marque une protéine de M_r = 99 000; cette bande migre avec la forme non réduite du RAK du cerveau de grenouille[13]. À la microscopie optique, cette protéine se concentre fortement dans plusieurs zones du S.N.C. du rat, notamment dans les cellules pyramidales de l'hippocampe et les cellules de Purkinje du cervelet[17]. Elle est absente des autres tissus du rat. Nous tentons actuellement d'isoler et de séquencer les clones de l'ADNc codant cette protéine, afin de déterminer si la protéine de M_r = 99 000 du cerveau du rat est une homologue de la sous-unité de liaison de M_r = 48 000 du cerveau de grenouille[17,18]. Nous pensons que cette protéine du cerveau du rat pourrait faire partie du RAK des mammifères ou d'un sous-type apparenté de récepteur.

La caractérisation moléculaire des récepteurs d'aminoacides excitateurs n'en est qu'à ses débuts. Outre les questions posées plus haut sur les RAK, il reste dans ce vaste domaine plusieurs aspects importants à élucider. Par exemple, quels sont les rapports structurels et fonctionnels entre les récepteurs de l'acide kaïnique, du quisqualate et du NMDA? Le glutamate et l'aspartate en sont-ils les seuls coordonnats endogènes, ou existe-t-il d'autres substances qui interagissent avec ces récepteurs? Il sera de première importance de démontrer d'autres liens entre ces récepteurs et les maladies neurologiques. Déjà, de nombreuses observations nous font penser que les récepteurs d'aminoacides excitateurs interviennent dans l'apprentissage et la mémoire[19] et qu'il jouent un rôle dans plusieurs maladies, telles l'épilepsie et les atteintes cérébrales ischémiques[20,21]. La caractérisation moléculaire plus poussée de ces récepteurs permettra une meilleure compréhension de ce rôle et la mise au point de médicaments efficaces.

Références

1. Watkins JC, Evans RH. *Excitatory amino acid neurotransmitters*. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1981; 21: 165-204

2. Foster AC, Fagg GE. *Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes. Their characteristics and relationship to synaptic receptors*. Brain Res 1984; Reviews 7: 103-164.

3. Slevin JT, Collins JF, Coyle JT. *Analogue interactions with the brain receptor labelled by ^{3}H-kainic acid*. Brain Res 1983; 265: 169-172.

4. Debonnel G, Beauchesne L, de Montigny C. *Domoic acid, the alleged "mussel toxin" might produce its neurotoxic effect through kainate receptor activation: an electrophysiological study in the rat dorsal hippocampus*. Can J Physiol Pharmacol 1989; 67: 29-33.

5. London ED, Klemm N, Coyle JT. *Phylogenetic distribution of ^{3}H-kainic acid binding sites in neural tissue*. Brain Res 1980; 192: 463-496.

6. Hampson DR, Huie D, Wenthold RJ. *Solubilization of kainic acid binding sites from rat brain*. J Neurochem 1987; 49: 1209-1215.

7. Hampson DR, Wenthold RJ. *A kainic acid receptor from frog brain purified using domoic acid affinity chromatography*. J Biol Chem 1988; 263: 2500-2505.

8. Pfeiffer F, Graham D, Betz H. *Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord*. J Biol Chem 1982; 257: 9389-9393.

9. Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, et coll. *Sequence and functional expression of the GABAA receptor shows a ligand-gated receptor super-family*. Nature 1987; 328: 221-227.

10. Noda M, Takahashi H, Tanabe T, et coll. *Primary structure of (α-subunit precursor of torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence*. Nature 1982; 299: 793-797.

11. Hampson DR, Huie D, Wenthold RJ. *Properties of solubilized kainic acid binding sites from rat and frog brain*. J Neurochem 1987; 48: (Suppl.) S37D.

12. Mayer ML, Vylicky L. *Concanavalin A selectively reduces desensitization of mammalian neuronal quisqualate receptors*. Proc Natl Acad Sci 1989; 86: 1411-1415.

13. Hampson DR, Wheaton KD, Dechesne CJ, Wenthold RJ. *Identification and characterization of the ligand binding subunit of a kainic receptor using monoclonal antibodies and peptide mapping*. J Biol Chem (sous presse).

14. Dechesne CJ, Oberdorfer MD, Hampson DR, et coll. *Analysis of kainic acid receptor immunoreactivity in the frog central nervous system using monoclonal and polyclonal antibodies: Evidence for synaptic and extrasynaptic localization* (sous presse).

15. Gregor P, Eshar N, Ortega A, Teichburg VI. *Isolation, immunochemical characterization and localization of the kainate subclass of glutamate receptor from chick cerebellum*. EMBO J 1988; 7: 2673-2679.

16. Klein AU, Niederoest B, Winterhalter KH, Cuenod M, Streit P. *A kainate binding protein in pigeon cerebellum: purification and localization by monoclonal antibody*. Neurosci Lett 1988; 95: 359, 364.

17. Hampson DR, Banner C, Dechesne CJ, Wenthold RJ. *Analysis of a kainic acid receptor immuno-related protein in rat and frog brain*. Soc Neurosci Abstr 1989; 15(1): 955.

18. Wada K, Nakatani Y, Kusano K, et coll. *Isolation and characterization of a complementary DNA encoding a putative kainic acid receptor subunit in frog brain*. Soc Neurosci Abstr 1989; 15(1): 532.

19. Collingridge GL, Bliss TVP. *NMDA receptors – their role in long-term potentiation*. Trends Neurosci 1987; 10: 288-293.

20. Ben-Ari Y. *Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy*. Neurosci 1985; 14: 375-403.

21. Rothman SM, Olney JW. *Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage*. Ann Neurol 1986; 19: 105-111.

15. Neuropathologie humaine de l'intoxication encéphalopathique par une toxine des moules

S. Carpenter

À l'Institut neurologique de Montréal on a examiné les cerveaux de 4 sujets ayant manifesté des symptômes neurologiques après avoir consommé des moules en novembre 1987. Ils sont décédés 7, 12, 24 et 98 jours après l'ingestion. La mort du dernier patient, survenue 3 mois après l'intoxication aiguë, ne peut pas être directement reliée à celle-ci, bien que cette personne ait souffert de troubles persistants de la mémoire immédiate et qu'elle soit restée hyporéflexique.

Les malades étaient âgés de 71 à 84 ans. Ils montraient diverses autres anomalies anatomo-pathologiques qui soit existaient avant l'intoxication, soit qui n'étaient pas reliées: chez le n° 1 cardiomégalie, néphro-angiosclérose et un ancien infarctus au putamen droit; chez le n° 2 dégénérescence amyloïde généralisée du foie, de la rate, de la thyroïde, des reins et de l'intestin, gastrite et entérite hémorragiques terminales, broncho-pneumonie; chez le n° 3 cardiomégalie et coronaropathie de gravité moyenne, grave athérosclérose aortique, un ancien infarctus lacunaire de petite taille au noyau amygdalien gauche et un infarctus hémorragique récent à la région pariéto-occipitale gauche; chez le n° 4 coronaropathie sévère, cardiomégalie infarctus du récent myocarde, calcification des valvules mitrale et aortique, athérosclérose aortique sévère, épanchements pleuraux et péricardique, ascite, emphysème sévère, œdème pulmonaire, des infarctus cérébraux récents et anciens.

Les lésions cérébrales imputables à l'intoxication sont semblables du point de vue de leur localisation dans tous les cas, bien que la nature de ces lésions varie selon leur stade d'évolution au moment du décès. Dans tous les cas, l'hippocampe et le subiculum sont sévèrement touchés, mais jusqu'à un certain point l'aire H2 de l'hippocampe est épargnée; le fascia denté est touché dans 3 cas sur 4. Le noyau amygdalien à l'exception de sa partie externe, le cortex piriforme, la couche polymorphe du bulbe olfactif, le noyau du nerf acoustique, la région septale et l'avant-mur sont touchés dans tous les cas. Chez trois des patients, le cortex de l'insula et de la face inférieure du lobe frontal est touché, l'atteinte se limitant à la sixième couche dans un cas et s'étendant à la cinquième dans deux autres. C'est le 4e patient, qui ne présente pas de lésions corticales, qui a survécu le plus longtemps. Tous montrent des lésions au thalamus, le noyau sous-médial étant le plus régulièrement touché. Le cervelet est indemne, à ceci près que le 2e malade montre une perte focale de quelques-unes des cellules de Purkinje probablement antérieure à l'intoxication. Le seul échantillon de moelle épinière prélevé est un segment dorsal dans ce dernier cas; il est normal, de même qu'un échantillon de nerf périphérique prélevé chez le même patient.

Chez le malade décédé 7 jours après l'intoxication, les régions touchées montrent des neurones eosinophiles atrophiés qui laissent souvent autour d'eux un vide frappant. On observe une certaine tendance à la vacuolisation fine du neuropile dans les régions gravement atteintes de l'hippocampe et du subiculum. Les noyaux des astrocytes des régions atteintes tendent à grossir et leur nombre à augmenter.

Dans le cerveau du patient décédé 12 jours après l'intoxication, les régions atteintes montrent également des neurones eosinophiles atrophiés. Il y a un début de neuronsphagie, notamment dans la partie tout à fait antérieure de l'hippocampe; certains neurones semblaient avoir complètement disparu, comme dans la plaque terminale. L'hypertrophie des noyaux des astrocytes est plus frappante; les astrocytes de certaines régions, tel le noyau amygdalien, montre parfois une coloration cytoplasmique. Dans l'aire H1 de l'hippocampe, il est intéressant de noter qu'il n'y a aucune altération des astrocytes. Cela indique probablement des lésions locales graves d'emblée plutôt qu'un processus plus lent à survenir. Dans la couche des cellules polymorphes de l'hippocampe, et parfois dans la couche pyramidale, on observe de petites formations rondes rose pâle d'environ 10 µ de diamètre, qui représentent probablement des segments d'axones enflés. Un petit nombre de formations semblables existait également au même endroit dans le premier cas.

Chez le n° 3 décédé au bout de 24 jours, la plupart des neurones touchés ont disparu, sauf dans le thalamus où il reste des neurones eosinophiles atrophiés dans les noyaux postéro-interne et antéro-interne. Dans l'aire H1 de l'hippocampe, la perte neuronale s'accompagne d'un collapsus tissulaire dans la couche pyramidale. Le tissu collabé contient des macrophages; l'endothélium de certains vaisseaux est hyperplasié. Il y a quelques neurones minéralisés. On voit des astrocytes réactifs autour du tissu désintégré mais rarement à l'intérieur. On observe aussi un collapsus tissulaire dans le noyau amygdalien gauche.

Les lésions que présente le patient décédé 98 jours après l'intoxication sont comparables à celles observées chez le précédent, sauf qu'il ne reste aucun neurone eosinophile. Il existe un collapsus tissulaire dans l'aire H1 de l'hippocampe, alors que d'autres régions atteintes ne montrent qu'une perte neuronale généralisée, accompagnée de gros astrocytes réactifs parmi un peu de microglie résiduelle. De rares neurones minéralisés sont observés dans le tissu collabé.

Il pourrait s'avérer difficile d'établir une distinction entre les lésions survenues dans ces cas et celles de l'hypoxie. L'hippocampe peut être touché dans les deux cas selon une distribution comparable. Le caractère des altérations neuronales aiguës est presque le même (autant que nous puissions en juger par l'histologie *post mortem*), mais les tuméfactions axonales roses que nous avons observées dans l'hippocampe dans les deux premiers cas n'ont pas été décrites dans l'hypoxie. Le cortex cérébral dans celle-ci tend à montrer une nécrose laminaire plus fréquemment observée dans la troisième couche et se limitant rarement à la

sixième; cette nécrose prédomine aux régions limitrophes entre les aires d'irrigation artérielle et non au cortex de l'insula et de la face inférieure du lobe frontal. Si les noyaux amygdaliens peuvent être touchés dans l'hypoxie, ce sont les cellules de Purkinje et les noyaux gris centraux qui y sont le plus sensibles. Il est peu probable que des lésions de la base du cerveau antérieur surviennent dans l'hypoxie.

Faisons une brève comparaison entre les lésions apparues dans ces 4 cerveaux et celles observées chez des rats après injection d'acide kaïnique par voie générale. Ici les lésions touchent l'hippocampe (en particulier le subiculum et les aires CA3 et CA1), le complexe amygdalien et le cortex olfactif sus-jacent, le thalamus et des parties variables du néocortex dans les couches 5 et 6. On note certaines différences; par exemple, dans les cas observés chez l'homme, nous l'avons vu, il y a atteinte du bulbe olfactif et du fascia denté.

En résumé, les lésions cérébrales constatées chez l'homme à la suite d'une intoxication encéphalopathique induite par une toxine des moules, sont relativement stéréotypées: nécrose neuronale, en particulier dans l'hippocampe, épargnant jusqu'à un certain point l'aire H2 mais touchant fréquemment le fascia denté; la nécrose est également observée dans le complexe amygdalien et le cortex sus-jacent, avec une épargne relative du noyau latéral, dans l'avant-mur surtout en avant, la sixième couche du cortex de l'insula et de la face inférieure du lobe frontal. Il y a des lésions parsemées au tubercule olfactif, au noyau du nerf acoustique et, à des degrés variables, au thalamus. Le syndrome amnésiant, frappant chez les patients ayant survécu à une intoxication grave, peut être attribué aux lésions de l'hippocampe. On n'a pas de données pertinentes sur les neurones moteurs périphériques.

Référence

1. Schwob JE, Fuller T, Price JL, Olney JW. *Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study*. Neuroscience 1980; 5: 951-1014.

Discussion

Question provenant de la salle : Vous avez fait état de la région septale. Pourriez-vous élaborer davantage sur les lésions septales chez ces sujets?

S. Carpenter : Les coupes que nous avons pour cette région ne sont pas très bonnes et je ne suis pas vraiment un spécialiste de cette région. Je ne crois pas pouvoir en dire davantage.

J. Campbell, Ottawa : Je vous ai fourni une question par écrit. Elle est plutôt complexe et vous désirerez peut-être répondre à une période ultérieure, mais j'aimerais beaucoup entendre vos observations sur la situation que j'ai décrite dans le courant de la journée.

S. Carpenter : Il s'agit d'une question médico-légale au sujet d'un de ces malades. Sans la lire, quelle preuve avons-nous qu'il s'agit vraiment de l'acide domoïque ou que le malade a bel et bien été intoxiqué par les moules? Eh bien, je dirais que la preuve est évidemment circonstancielle. Nous ne connaissons pas la concentration d'acide domoïque dans l'organisme du malade, c'est pourquoi on dit qu'elle est circonstancielle. Cependant, j'ajouterai qu'il s'agit d'une preuve circonstancielle très forte, et en toute sincérité, je n'ai moi-même aucun doute à ce sujet.

Question provenant de la salle : J'aimerais savoir qu'elle impression globale vous avez au sujet des manifestations neuropathologiques. Seriez-vous d'accord pour dire qu'en gros, les observations que vous avez faites correspondent en fait à une exagération des modifications normales liées au vieillissement? Deuxièmement, y avait-il dépigmentation du locus niger? Troisièmement, y avait-il des lésions hypothalamiques?

S. Carpenter : Je n'ai trouvé aucune lésion dans l'hypothalamus. Le locus niger était à toute fin pratique normal. Vous savez que chez toute personne de cet âge, on observe un peu de pigment dans les macrophages, mais il y en avait très peu. Le second patient avait un peu d'enchevêtrement neurofibrillaire, mais assez peu, et encore une fois c'est une chose à laquelle je m'attendais. Je ne crois pas qu'aucune des manifestations que j'ai décrites soit une accentuation des modifications qui accompagnent le vieillissement normal.

16. Neuropathologie de l'intoxication expérimentale par l'acide domoïque chez les rats et les primates non humains

L. Tryphonas, J. Truelove, F. Iverson, E. Todd et E.A. Nera

Introduction

Une intoxication alimentaire survenue au Canada à la fin de l'année 1987 a été rapportée à la consommation de moules de culture (*Mytilus edulis* L.) en provenance de l'estuaire du fleuve Cardigan à l'Île-du-Prince-Édouard. L'analyse chimique des échantillons de moules a révélé qu'elles étaient fortement contaminées par l'acide domoïque (AD). L'étude épidémiologique a montré que la présence de fortes concentrations de cet acide dans ces moules coincidait avec une floraison intense de phytoplancton dominée par la diatomée pennée *Nitzschia pungens* f. *multiseries* – un aliment de base des moules qui lui-même contient ou est capable de synthétiser d'importantes quantités d'AD[1,2].

Les constatations épidémiologiques indiquaient que le problème de toxicité était bien délimité aux moules du Cardigan et que la toxine n'est pas très puissante. On a estimé en effet que plusieurs milliers de personnes ont dû consommer des moules contaminées; or 200 cas de maladie et trois décès ont été enregistrés chez des sujets âgés[3,4].

Le but de cette présentation est de résumer nos trouvailles préliminaires sur l'anatomie pathologique de l'intoxication par l'AD chez le rat et le singe après administration par voie buccale ou parentérale d'extraits de moules toxiques ou d'AD tiré de moules contaminées.

Méthodes et résultats

Premières étapes

Au début des recherches, alors que nous étions confrontés à une substance inconnue, nous avons fait quelques expériences avec des rongeurs (rats Sprague-Dawley) et des simiens (*M. fascicularis*) pour tenter de définir les caractéristiques toxicologiques de la substance toxique présente dans les moules de culture suspectes récoltées dans l'estuaire du Cardigan. Pour reproduire au plus près possible les conditions du risque chez l'homme, les extraits de moules toxiques et l'acide domoïque furent d'abord administrés *per os*. Plus tard, alors que nous en savions davantage, nous avons plutôt opté pour les voies intrapéritonéale et intraveineuse, afin d'économiser les quantités infimes d'AD disponibles à ce moment-là et d'obvier à l'effet émétique du toxique et les aléas de son absorption intestinale.

Tableau 1.
Résumé du protocole expérimental et de la survenue des signes cliniques et des lésions chez des singes auxquels on administre de l'extrait ou de l'acide domoïque brut *per os*

Dose[a] (mg/kg)	Période d'observation (jours)	Signes G.I.	Signes S.N.C.
6,62[b]	17	+	-(?)
6,47	20	+	-(?)
5,63[c]	23	+	-(?)
5,89	44	+	-(?)
5,21[d]	22	+	-(?)
0,00[e]	22	-	-
0,00[f]	15	-	-

(?) = discutable
a = équivalent en acide domoïque
b = ajout de glutamate de monosodium (MSG) (à 0,25 p. 100)
c = ajout de diméthylsulfoxide (DMSO) (1 g)
d = acide domoïque pur en Polybuffer (pharmacia)
e = polybuffer (seul)
f = témoin non traité

Études morphologiques

Les singes et des rats sont sacrifiés sous anesthésie profonde (pentobarbital ou chloroforme) par exsanguination et perfusion intracardiaque à la solution de Ringer-lactate héparinisée suivie de 0,2 à 2-3 litres d'un fixatif constitué de 2 p. 100 de glutaraldéhyde et de 1 p. 100 de paraformaldéhyde dans une solution tampon 0,1 M de cacodylate de sodium, d'un pH de 7,2, ou un tampon neutre de formaline. On effectue des coupes de 6 et 10 µm et les colore à l'hématoxyline-éosine, au bleu de luxol rapide, au Bodian et au Nissl. Certaines coupes choisies sont colorées à l'acide periodique-Schiff et par la méthode de Holzer. Certains coupes plus épaisses sont colorées au bleu de toluidine.

La surface vacuolaire interneuronale totale chez les cinq rats traités et les cinq rats témoins est estimée morphométriquement dans les aires CA3 et CA3b de l'hippocampe en utilisant le système d'analyse d'images Zeiss IBAS 2 et une caméra vidéo Hamamatsu sur un photomicroscope Zeiss III.

Administration per os

Singes: Deux expériences sont faites séparément à bref intervalle afin de déterminer les effets toxiques des extraits de moules suspectes ou de l'acide domoïque administrés par la bouche à des Cynomolgus adultes (*M. fascicularis*). La première a comme

objectif de reproduire au plus près possible le risque chez l'homme. Afin de faciliter l'absorption de l'AD, on administre également soit du glutamate monosodique (GMS), soit du diméthylsulfoxide (DMSO) à deux singes. On les observe dans leurs cages durant plusieurs jours (tableau 1).

Ils commencent bientôt à avoir des troubles gastro-intestinaux évidents, pour certains dès 2 h après l'ingestion, et ces troubles durent pour certains près de 70 h; ces délais varient beaucoup. Il s'agit surtout d'anorexie (3/5), de salivation (2/5), de haut-le-coeur, (1/5), de vomissements (3/5) et de diarrhée (3/5). Les signes cliniques de dépression du système nerveux central sont plus ou moins discutables: désorientation (2/5), tremblements (1/5), prostration (2/5), frissons de chien mouillé (3/5) et retrait (3/5). Le délai d'apparition et la durée de ces troubles du S.N.C. varient aussi: ils commencent dans les premiers cas une demi-heure après l'administration et durent au maximum 100 h. Même chez le singe dont les signes neurologiques durent le plus longtemps, on note une discontinuité dans leur présence.

La deuxième étude a pour but d'établir une relation dose-réponse. À cet effet, on administre de l'acide domoïque pur à quatre Cynomolgus qui sont ensuite observés dans leur cage durant un maximum de 6 jours (tableau 2). Chez deux singes la durée des nausées et vomissements reflète les quantités administrées: celui auquel on a fait prendre 10 mg d'acide domoïque/kg de poids corporel vomit une quantité considérable de la dose 1 h et 30 min après l'administration. Les moments exacts de déclenchement des divers signes cliniques sont présentés ailleurs dans le présent rapport[3].

Les altérations histopathologiques chez ces singes traités par voie buccale sont soit réduites au minimum, soit discutables, soit tout simplement inexistantes. Il s'agit le plus souvent de la présence de neurones sombres, le plus souvent triangulaires, entourés d'un espace vide. Les neurones situés dans les couches corticales profondes, en particulier dans les sillons, sont les plus fréquemment touchés. Il n'y a rien à signaler dans l'hippocampe.

Administration par voie intraveineuse

Singes: Cinq Cynomolgus reçoivent une injection intraveineuse d'acide domoïque pur en soluté physiologique (tableau 3). Immédiatement après l'injection, ils sont mis dans leur cage et observés en permanence au moyen d'une caméra vidéo jusqu'à un maximum de 5 h (tableau 3). Tous les singes ainsi traités commencent à avoir des haut-le-cœur 4 à 17 minutes après l'injection; ils durent de 4 à 119 minutes. Cette durée est directement proportionnelle à la dose administrée (Iverson et coll., dans le présent rapport).

Des lésions typiques du S.N.C. sont détectées seulement dans le faisceau solitaire du singe qui a reçu 0,5 mg d'acide domoïque/kg; il s'agit de deux petits foyers symétriques bilatéraux de raréfaction contenant de nombreuses vacuoles de tailles variables (figure 1). Il n'y a pas de réaction de la névroglie.

Administration par voie intrapéritonéale

Singes: Un singe reçoit par voie intrapéritonéale 4 mg d'acide domoïque pur/kg de poids corporel dans un volume porté à 10 ml par addition de soluté physiologique. Dans les deux minutes, le singe commence à montrer une mastication et une salivation incessantes, fait mine de vomir à plusieurs reprises (déglutition) et se met à vomir en jet. Par la suite on observe une faiblesse, des postures anormales, des grincements de dents, un état de léthargie, une fixité du regard, des haut-le-cœur répétés, puis la mort 3 h 1/2 après l'administration.

L'examen du S.N.C. et de la rétine montre des lésions compatibles avec une excitotoxicité (figure 2).

Rats: Dix-sept rats femelles Sprague-Dawley pesant 180 ±15 g reçoivent une injection de 0, 1, 2, 4, ou 7,5 mg d'acide domoïque/kg de poids corporel (tableau 4). Immédiatement après l'injection, ils sont placés en boîtes de plastique transparent et observés pendant une période maximum de 24 h. Les signes cliniques, observés chez les rats ayant reçu 2 mg ou plus d'acide domoïque, sont le grattage de l'omoplate, des crises convulsives de

Tableau 2.
Résumé du protocole expérimental et de la survenue des signes cliniques chez des singes auxquels on a administré de l'acide domoïque purifié *per os*

Dose (mg/kg)	Période d'observation (jours)	Signes cliniques
10,00	6	+
5,00	4	+
0,50	4	-
0,00*	6	-

*Témoin non traité

Tableau 3.
Résumé du protocole expérimental et de la survenue des signes cliniques et des lésions chez des singes Cynomolgus auxquels on a administré de l'acide domoïque par voie intraveineuse

Dose (mg/kg)	Période d'observation (heures)	Signes G.I.	Signes S.N.C.	Lésions
0,500	3:42	+	+	+
0,200	4:50	+	+	-
0,050	4:53	+	+	-
0,025	3:55	+	+	-
0,000*	5:00	-	-	-

*Témoin non traité

sévérité variable, un état de mal épileptique, la démarche «en crabe»[6,7].

On constate des lésions du S.N.C. seulement chez les rats ayant des signes cliniques évidents de toxicité. Il s'agit d'une encéphalopathie et d'une rétinopathie sélectives aiguës. Les détails de la distribution régionale des lésions ont été présentés antérieurement[7]. En bref, elles apparaissaient dans les organes périventriculaires[8], le système limbique et l'hippocampe. Les moins graves d'entre elles consistent en une vacuolisation du neuropile, l'hyperchromasie des corps neuronaux qui sont ratatinés et présentent des dentelures multiples de leurs profils, un gonflement astrocytaire (figure 3). On observe également la nécrose de certains neurones. La vacuolisation du neuropile est presque deux fois plus importante dans la partie caudale que dans la partie rostrale de l'hippocampe (figure 4). Les lésions oculaires se trouvent le plus souvent dans les couches profondes.

Rien n'a été observé chez les rats témoins, chez les rats n'ayant reçu qu'une dose de 1 mg d'acide domoïque/kg de poids corporel et chez trois des quatre rats qui ont reçu une dose de 2 mg/kg.

Discussion

Les résultats de ces recherches montrent que l'administration par voie buccale d'extraits de moules toxiques ou d'acide domoïque extrait de moules contaminées entraîne chez le singe une intoxication transitoire caractérisée par des troubles du système gastro-intestinal et du S.N.C.. L'intoxication de plutôt courte durée qui suit l'administration d'une dose très élevée d'acide domoïque (tableaux 1 et 2) renforce l'idée que l'acide domoïque a une difficulté considérable à traverser la barrière digestive[5]. Cependant, malgré cette faible capacité d'absorption, il apparaît sur la foi des travaux exécutés jusqu'à ce jour que la quantité d'acide domoïque entrée en circulation est suffisante pour exciter le S.N.C.

Contrairement à la réponse relativement limitée chez les singes traités par voie buccale, les manifestations toxicologiques chez les singes et les rats traités par voie intrapéritonéale ou intraveineuse sont beaucoup plus graves et mettent même la vie des animaux en danger. Cette constatation fait croire qu'une fois dans le torrent sanguin l'acide domoïque peut facilement avoir accès au système nerveux. Les organes périventriculaires possédant une barrière hémato-encéphalique incomplète ont été signalés comme étant les sites par lesquels l'acide kaïnique, une excitotoxine bien étudiée, entre dans le S.N.C.[9]. On pense que l'acide domoïque, un analogue de conformation de l'acide kaïnique, utilise la même voie.

Le S.N.C. des rats et des simiens est dans les deux cas sensible aux effets indésirables de l'acide domoïque. Les deux espèces montrent des lésions comparables qui ressemblent du point de vue qualitatif à celles signalées pour l'acide kaïnique[6,8,9]. Cependant, la similarité de la réponse dans les deux espèces n'est pas pour autant quantitative. Les différences observées portent sur la répartition des sites cibles dans le S.N.C. (tableau 4) et sur la gravité des lésions dans une cible donnée. Il est difficile d'expliquer pleinement ces différences à l'heure actuelle. On a prétendu qu'une activité épileptoïde prolongée joue un rôle clé dans la détermination de lésions intéressant l'hippocampe[10,11].

L'étroite ressemblance de l'intoxication par l'acide domoïque et par l'acide kaïnique donne à penser à une même pathogénèse. Cependant, d'autres études sont nécessaires: 1) pour déterminer si les différences observées dans la distribution des sites cibles et la gravité des lésions dans l'intoxication par l'acide domoïque et par l'acide kaïnique sont propres à ces composés ou dues aux différences de dosage et de durée d'exposition; 2) pour établir si l'acide domoïque utilise les récepteurs postsynaptiques de l'acide kaïnique ou des récepteurs distincts; 3) pour vérifier l'étendue des lésions du S.N.C. causées par les extraits de moules toxiques contenant de l'acide domoïque[7].

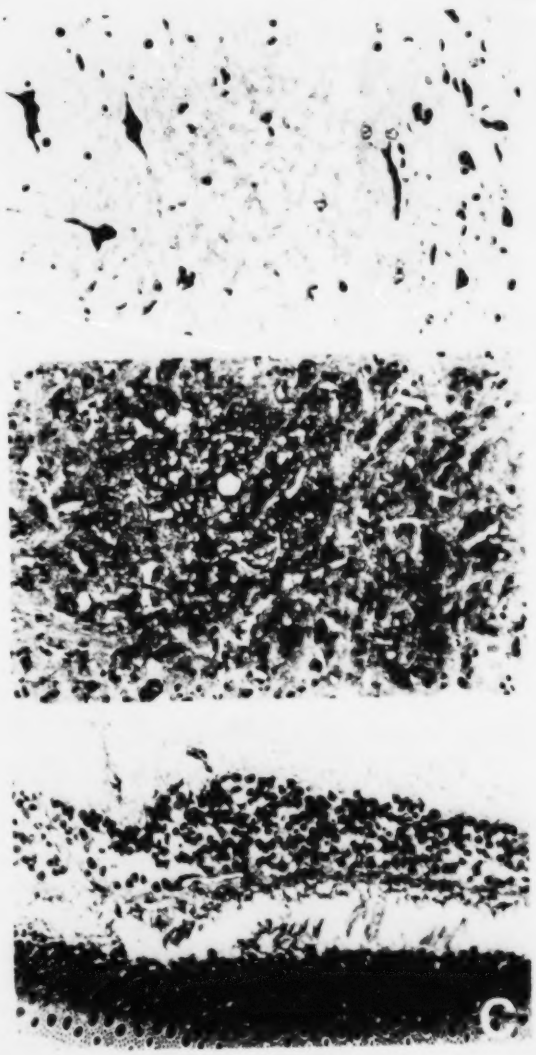
La pertinence de ces constatations expérimentales pour expliquer les lésions cérébrales causées par des moules toxiques signalées chez l'homme, est difficile à estimer à l'heure actuelle; la question est encore à l'étude. La plupart de nos données sont les résultats d'études à brève échéance menées chez de jeunes animaux en bonne santé. Néanmoins, les études que nous avons effectuées sur des singes avec des doses *per os* ou de faibles doses par voie intraveineuse reflètent à un point considérable le tableau clinique observé chez les humains qui ont guéri et font penser que les lésions gliotoxiques et dendrito-toxiques présumées du S.N.C. dont ont souffert ces personnes étaient légères ou de gravité moyenne et donc réversibles[6]. De même, elles montrent que, d'une part, les troubles gastro-intestinaux (nausée, haut-le-cœur, salivation, vomissements) ne sont pas dus à une irritation directe du tube digestif mais plutôt à la stimulation du centre du vomissement, qui est l'une des manifestations excitatrices de l'acide domoïque. Les lésions de l'area postrema

Figure 1
Foyer de vacuolisation dans le bulbe rachidien d'un singe Cynomolgus ayant reçu une dose de 0,5 mg d'acide domoïque/kg de poids corporel, par voie intraveineuse, (H&E X35). Encart: même foyer (X160).

renforcent encore l'idée que l'irritation locale directe du centre du vomissement est la cause des nausées et des vomissements. L'acide glutamique et ses analogues sont décrits comme possédant des propriétés émétiques[12]. D'autres études sont nécessaires pour déterminer le seuil d'irréversibilité des lésions du S.N.C. et pour comprendre le rôle que des facteurs sous-jacents, telles une perfusion encéphalique compromise et une accentuation de l'absorption intestinale de l'acide domoïque, joueraient dans l'apparition chez l'homme d'une encéphalopathie due à des moules toxiques.

Les résultats obtenus jusqu'à ce jour à partir des cas d'intoxication chez l'homme et de nos études de toxicité, indiquent que le type d'intoxication par les mollusques dont nous traitons dans ce symposium est différent d'au moins deux autres types connus d'intoxication par les mollusques, à savoir l'intoxication paralysante causée par l'ingestion de bivalves contaminés par la neurotoxine des dinoflagellés du genre *Alexandrium* ou *tamarense* et l'intoxication neurotoxique causée par l'ingestion de mollusques contaminées par *Gymnodinium breve*. Une des caractéristiques de l'intoxication à l'ingestion de bivalves contaminés par l'acide domoïque produit par la diatomée *Nitzschia pungens* f. *multiseries*, est que, contrairement à la saxitoxine produite par *Alexandrium* qui bloque la propagation de potentiels d'action nerveuse et musculaire et à la toxine de *Gymnodinium breve* qui cause des paresthésies, la première entraîne une symptomatologie et des altérations anatomo-pathologiques qui sont caractéristiques des *excitotoxines*. On suggère donc que cette intoxication soit appelée l'«intoxication amnésiante excitoxique par les mollusques». Ce terme englobe au moins trois facteurs clés qui aident à définir ce syndrome. «Excitoxique» se réfère au mécanisme de lésions du S.N.C., «amnésiante» (proposition de J. Hockin citée par Wright et coll.) indique les séquelles les plus graves chez les individus atteints, et «mollusques», qui est plus large que la désignation «moules», informe sur la source alimentaire de la toxine. Il semble peu justifié d'utiliser le terme «intoxication par l'acide domoïque» pour définir les intoxications chez l'homme. Les malades n'ont pas absorbé de l'acide domoïque pur, et nous connaissons peu de choses à l'heure actuelle sur la réponse de l'homme à l'acide domoïque pur.

Figure 2
Vacuolisation dans (A) l'area postrema entre le noyau du grand hypoglosse (gauche) et celui du vague (X320), (B) le noyau du faisceau solitaire (X160), et (C) la couche interne de la rétine (X320) d'un singe Cynomolgus ayant reçu une dose de 4 mg d'acide domoïque/kg de poids corporel, par voie intrapéritonéale. H&E.



Références

1. Bates SS, Bird CJ, de Freitas ASW, et coll. Conseil national de recherches Canada. *The pennate diatom Nitzschia pungens as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada*. Can J Fish Aquat Sci 1989; 46: 1203-1215.
2. Wright JLC, Boyd RK, de Freitas ASW, et coll. *Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island*. Can J Chem 1989; 67: 481-490.

3. Teitelbaum JS, Zatorre RJ, Carpenter S, Gendron D, Cashman NR. *Neurological sequelae of domoic acid intoxication*. Ce Symposium, Présentation 5.

4. Perl TM, Bédard L, Kosatsky T. *Amnesic shellfish poisoning: a new clinical syndrome due to domoic acid*. Ce Symposium, Présentation 4.

5. Iverson F, Truelove J, Tryphonas L, Nera EA. *The toxicology of domoic acid administered systemically to rodents and primates*. Ce Symposium, Présentation 6.

6. O'Shaughnessy D, Gerber GJ. *Damage induced by systemic kainic acid in rats is dependent upon seizure activity. A behavioral and morphological study*. Neurotoxicology 1986; 7: 187-202.

7. Tryphonas L, Truelove J, Nera EA, Iverson F. *Acute neurotoxicity of domoic acid in the rat*. Toxicologic Pathol 1990; 18(1)(part 1): 1-9.

8. Olney JW. *Excitotoxic amino acids: Research applications and safety implications*. Dans: *Glutamic acid: Advances in biochemistry and physiology*. Filer LJ, Garattini S, Kare MR, Reynolds WA, Wurtman RJ, éds. New York: Raven Press, 1979; 287-319.

9. Olney JW. *Neurotoxicity of excitatory amino acids*. Dans: *Kainic acid as a tool in neurobiology*. McGeer G, Olney JW, McGeer PL, éds. New York: Raven Press, 1978; 95-121.

10. Tryphonas L, Truelove J, Todd E, Nera E, Iverson F. *Experimental oral toxity of domoic acid in cynomolgus monkeys (M. fascicularis) and rats. Preliminary investigations*. Food Chem Toxicol (sous presse).

11. Tryphonas L, Truelove J, Iverson F. *Acute parenteral neurotoxicity of domoic acid in cynomolgus monkeys (M. fascicularis)*. Toxicol Pathol 1990; 18(2): 297-303.

12. Sloviter RS. *"Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I. Acute electrophysiological and light microscopic studies*. Brain Res Bull 1983; 10: 675-697.

13. Olney JW, deGubareff T, Sloviter RS. *"Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. II. Ultrastructural Analysis of acute hippocampal pathology*. Brain Res Bull 1983; 10: 699-712.

14. Olney JW. *Excitotoxicity: an overview*. Ce Symposium, Présentation 12.

15. Wright JLC, Boyd RK, deFreitas ASW, et coll. *Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island*. Can J Chem 1989; 67: 481-490.

Discussion

J. Olney : J'aimerais dire que même si l'on a tendance à croire que les primates non humains ressemblent davantage à l'homme que d'autres espèces, en étudiant l'administration de glutamate *per os*, on a trouvé que son absorption est plus efficace chez les humains que chez les rongeurs, et qu'elle est beaucoup plus efficace chez les rongeurs que chez les singes. Ainsi, si vous administrez une dose donnée de glutamate *per os* à des singes, à des souris et à des êtres humains, l'espèce qui présente sous ce rapport le moins de ressemblance avec l'homme est le singe; il est donc difficile de savoir comment interpréter les constatations que l'on a faites ici sur l'administration *per os* à des singes. Il est difficile d'extrapoler à l'homme parce qu'il arrive parfois que les singes et l'homme soient très différents.

L. Tryphonas : Oui, je partage votre opinion. Cependant, les analyses préliminaires que nous avons réalisées indiquent que le rat n'absorbe pas, ou absorbe difficilement, l'acide domoïque, tandis qu'il semble qu'un primate non humain y parvienne avec plus de succès.

Figure 3

Vacuolisation dans (A) le bulbe olfactif (X360), (B) le noyau arciforme (X360), la région CA3 de l'hippocampe (X60) et la couche interne de la rétine (X360) d'un rat ayant reçu une dose de 4 mg d'acide domoïque/kg de poids corporel, par voie intrapéritonéale. H&E.

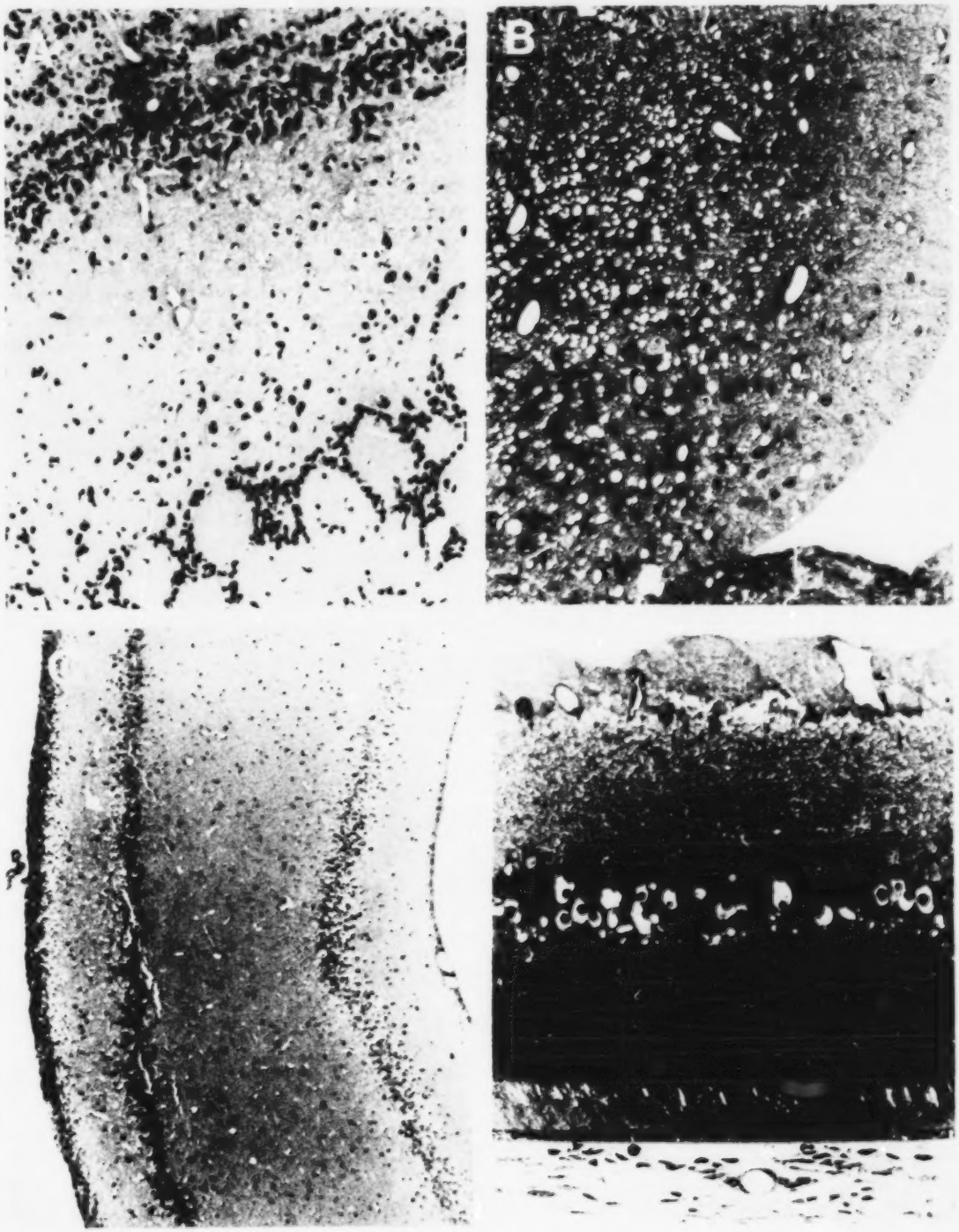


Figure 4
Estimation morphométrique de la vacuolisation de l'aire CA3 de l'hippocampe. Le pourcentage de la surface occupé par des vacuoles interneuronales dans la partie caudale de l'hippocampe est nettement supérieure à celle observée dans son extrémité rostrale (P≤05).

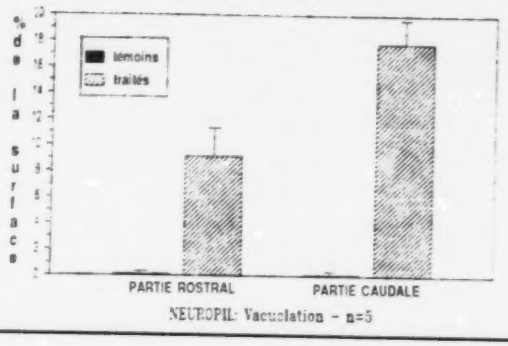


Tableau 4.
Répartition des lésions du S.N.C. chez des singes et des rats auxquels on a administré des extraits toxiques et de l'acide domoïque pur *per os*, i.p. ou i.v.

Voie	Acide domoïque (mg/kg)	Cortex olfactif	Noyau septal	Hippocampe	Hypothalamus	Bulbe rach.	Rétine
Singes							
Per os							
Extr. de moules	5,89-6,62	-	-	+[d]	-	-	-
Acide dom.[a]	0,50-10,00	-	-	+[d]	-	-	-
Intrapéritonéale							
Acide dom.[b]	4,00	-	-	+	+	+	+
Intraveineuse							
Acide dom.[b]	0,50	-	-	+[e]	-	+	-
Acide dom.[b]	0,02-020	-	-	+[e]	-	-	-
Rats							
Intrapéritonéale							
Acide dom.[c]	1,00	-	-	-	-	-	-
Acide dom.[c]	2,00-7,50	+	+	+	+	-	+

[a] = AD brut ou purifié
[b] = AD purifié
[c] = AD brut
[d] = On a publié plus tard la description des lésions[10]
[e] = idem[11]

17. *Toxicité des acides aminés excitateurs pour les grains du cervelet en culture primaire*

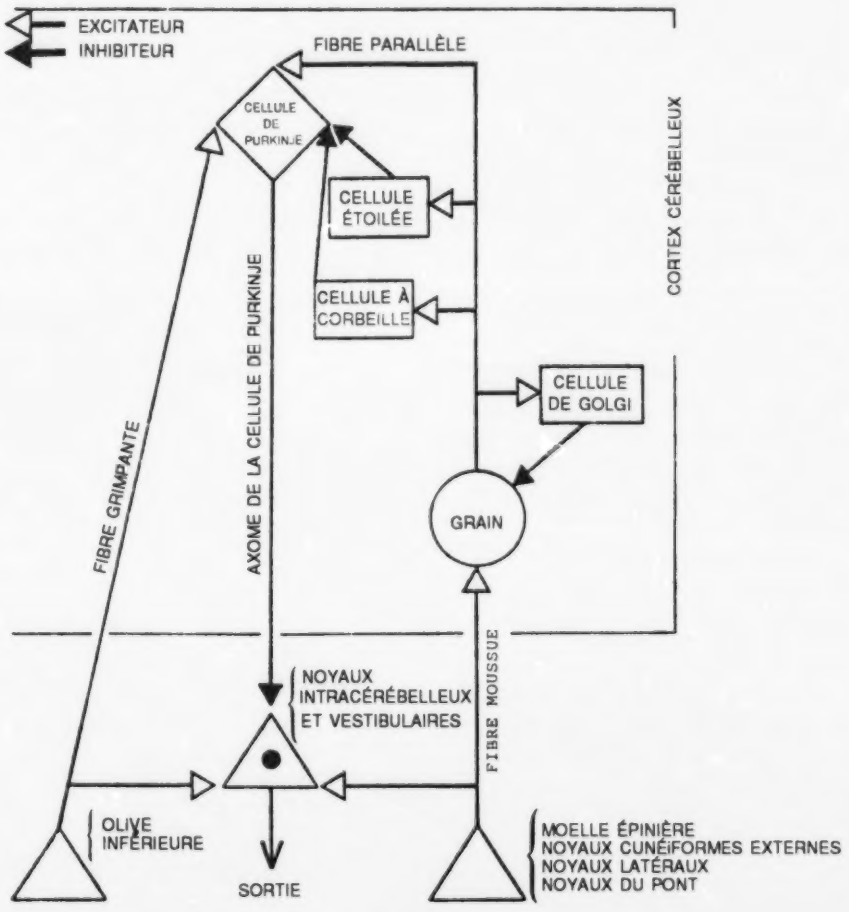
A. Novelli, J. Kispert, A. Reilly et V. Zitko

Résumé

Les cultures primaires de grains du cervelet représentent un système neuronal précieux pour l'étude de la physiologie, de la biochimie et de la toxicologie des acides aminés excitateurs[5,6,18,19,20,24]. Grâce à ce système, nous pouvons maintenant signaler la caractérisation de l'action biochimique et toxicologique d'un extrait de moules toxiques contenant un acide aminé excitateur, l'acide domoïque. Les résultats obtenus à l'aide d'un extrait de moules toxiques, d'un extrait de moules non toxiques et d'acide domoïque purifié montrent qu'il y aurait synergie entre l'acide domoïque et d'autres acides aminés excitateurs potentiellement neurotoxiques normalement présents dans les moules.

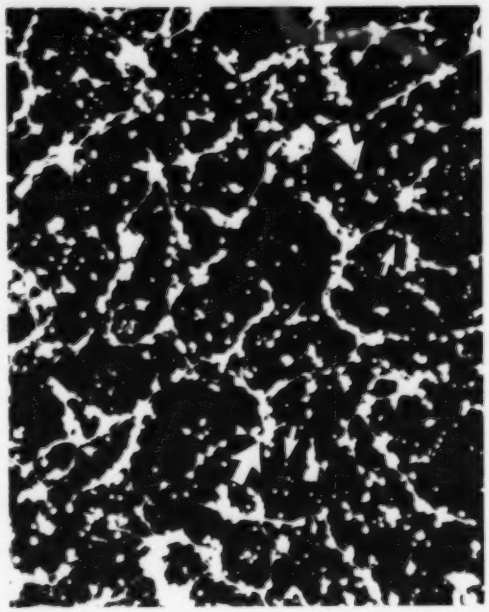
Dans le cortex cérébelleux, on trouve au moins cinq types de neurones : cellules de Purkinje, grains, cellules à corbeille, cellules étoilées et cellules à cylindraxe court (ou cellules de Golgi). Alors que les cellules de Purkinje constituent les seuls véritables neurones présents dans l'écorce cérébelleuse du fait qu'elles transmettent un influx inhibiteur, les grains y sont les seuls interneurones excitateurs. Ils reçoivent un influx excitateur en provenance des fibres moussues[27] et, en retour, excitent les cellules de Purkinje par l'intermédiaire des fibres parallèles. Par conséquent, les grains constituent un élément important dans l'élaboration des influx excitateurs reçus et transmis. L'excitation est fournie par la libération d'acides aminés excitateurs (AAE) endogènes, l'acide glutamique et l'acide aspartique[9]. Le neurotransmetteur servant à l'inhibition dans l'écorce cérébelleuse est l'acide gamma-aminobutyrique (GABA)[9]. Un schéma de l'architecture neuronale du cervelet est présenté dans la figure 1.

Figure 1
Schéma du réseau neuronal dans le cervelet : les grains du cervelet reçoivent et transmettent des influx excitateurs qu'ils intègrent. Description dans le texte.



Depuis 6-8 ans, on est en mesure de faire croître les grains du cervelet de rat en culture primaire à un haut degré d'homogénéité[5,18,20,31] : les grains prélevés du cervelet de jeunes rats âgés de huit jours évoluent jusqu'à une morphologie définitive en l'espace de quelques jours après l'ensemencement, comme on peut le voir dans la figure 2. D'après des études antérieures dans lesquelles on a procédé à une coloration immunologique des cultures à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines neuronales, plus de 97 % de la population cellulaire en culture est constituée de neurones, les astrocytes étant présents en quantité limitée (3 %)[18,31]. La majorité des neurones présents dans la culture sont morphologiquement identifiables comme des grains; on peut prévoir que seulement 5 % de la

Figure 2
Grains du cervelet en culture primaire.



†Les grains du cervelet ont été préparés d'après une méthode déjà publiée[20]. Après 8 jours de culture (JDC), la culture a été exposée au diacétate de fluorescéine, qui est un marqueur pour les cellules vivantes[20]. Sous une lumière fluorescente, le corps neuronal et les axones des neurones vivants (grosses flèches) présentent une brillante couleur verte. L'exposition simultanée des cultures au bromure d'éthidium (100 µm pendant 1 min) colore en orangé les noyaux nus des neurones morts (petites flèches). Des résultats semblables ont été obtenus jusqu'à 30-35 JDC. Pour les expériences signalées ici, on a utilisé des cultures âgées de 12 à 21 JDC. Les cultures neuronales ont reçu un supplément de 5,6 mM de glucose tous les quatre jours et l'eau perdue par évaporation a été remplacée.

Tableau 1.
Antagonisme de la stimulation de la formation du GMPc par les acides aminés excitateurs.

	% d'inhibition de la stimulation maximale		
	APV	MK-801	PDA
Acide glutamique (100 µm; -Mg^{++})	90	100	0
Acide kaïnique (1 00 µM)	10	40	57
Acide domoïque (10 µM)	12	12	0

PDA = acide *cis*-pipéridinedicarboxylique.
L'APV et le PDA ont été utilisés à une concentration de 1 mM, le MK-801 à 1 µM.
Les agonistes ont été ajoutés pendant 1 min.
Les antagonistes ont été ajoutés 1 min avant les agonistes

population neuronale totale sera constituée d'interneurones inhibiteurs[18], vraisemblablement des cellules étoilées. Les grains d'origine cérébelleuse en culture primaire conservent une caractéristique importante qu'ils possèdent *in vivo* : la présence de récepteurs d'acides aminés excitateurs (RAAE)[6,14,18,19,24].

Selon C.F. Stevens[28], on peut, en général, diviser les RAAE en deux sous-classes : type NMDA et type non-NMDA. Les RAAE de type NMDA sont activés par certains analogues de l'acide glutamique tels l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA), l'acide aspartique et l'acide quinolinique[12]. Le canal correspondant à ce type de récepteur, gouverné par l'ion Mg^{++}, est voltage-dépendant[11,21]; il permet le passage de grandes quantités d'ions Ca^{++}[16]. Deux types d'antagonistes sont connus pour les récepteurs de NMDA : 1) l'antagoniste du récepteur, l'acide D-(-)- 2-amino-5-phosphonovalérique (APV)[12], 2) le bloqueur du canal, le MK-801[32]. Le type non-NMDA de RAAE est activé par d'autres analogues de l'acide glutamique tels l'acide kaïnique, l'acide domoïque et l'acide quisqualique[1,12]. Le canal correspondant à ce type de récepteur n'est pas commandé par l'ion Mg^{++} et permet l'entrée de quantités moindres de Ca^{++}[3,10,12,16,30]. L'activation du récepteur de non-NMDA par l'acide quisqualique peut entraîner l'activation d'une protéine G qui, à son tour, active le renouvellement des phospholipides à inositol[29]. On ne connaît pas d'antagonistes spécifiques pour ce récepteur non-NMDA[12,33].

Dans les grains du cervelet en culture primaire, les RAAE sont couplés à l'activité de la guanylate-cyclase et donc à la production de guanosine-monophosphate cyclique (GMPc)[14,19]. Moins d'une minute après la stimulation des RAAE, la concentration intracellulaire de GMPc est d'environ 50-100 fois plus élevée que la concentration de base. La stimulation de la formation de GMPc par les AAE dépend du Ca^{++} extracellulaire; elle est commune aux deux types de RAAE, NMDA et non-NMDA; les modalités diffèrent selon les propriétés des deux types de RAAE. La stimulation de la formation du GMPc par les agonistes des récepteurs de NMDA, tel l'acide

Tableau 2.
La dépendance à l'égard du Mg^{++} extracellulaire de la neurotoxicité des acides aminés excitateurs est favorisée par l'abaissement de l'énergie cellulaire.[20]

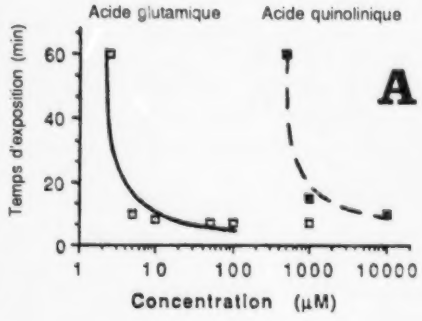
	Concentration neurotoxique minimale (μM) (30 min d'exposition)	
	$-Mg^{++}$	$+Mg^{++}$
Acide glutamique	2,5	25
Acide quinolinique	500	5000
Acide domoïque	1,5	2
Acide kaïnique	20	20

La neurotoxicité a été évaluée de la manière décrite dans la figure 3.

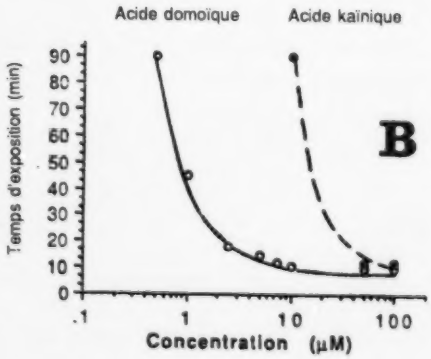
Le tampon d'incubation est privé de glucose 30 min avant l'addition des produits. Là où on l'indique, le tampon d'incubation est exempt de Mg^{++} (1 mM) depuis le début de l'expérience.

Figure 3
Temps d'apparition des signes précoces de neurotoxicité par les acides aminés excitateurs dans des cultures privées d'énergie.

A : Temps d'apparition de la neurotoxicité, en fonction de la concentration, de l'acide glutamique (ligne solide) et de l'acide quinolinique (ligne pointillée). La neurotoxicité a été induite en l'absence de Mg^{++} et de glucose dans le tampon d'incubation[20]. Les signes précoces de neurotoxicité sont l'apparition d'un gonflement et la perte de réfractivité décrites dans une publication antérieure[20]. Les signes de neurotoxicité sont apparus à peu près en même temps dans tous les neurones de la culture.



B : Temps d'apparition de la neurotoxicité, en fonction de la concentration, de l'acide domoïque (ligne solide) et de l'acide kaïnique (ligne pointillée). La neurotoxicité a été induite en l'absence de glucose et en présence de Mg^{++} dans le tampon d'incubation[20]. L'acide quinolinique et l'acide kaïnique se sont révélés en comparaison des agonistes plus faibles que l'acide glutamique et l'acide domoïque.



glutamique, est bloquée par : 1) le Mg^{++} extracellulaire[19]; 2) l'APV[19]; 3) le MK-801 (tableau 1). La stimulation de la formation de GMPc par les agonistes des récepteurs de non-NMDA, tel l'acide kaïnique, n'est pas réduite par la présence de Mg^{++} extracellulaire (1 mM)[19]; elle est faiblement inhibée par l'APV[19] ou le MK-801 (tableau 1). Comme dans le cas de l'acide kaïnique, la stimulation par l'acide domoïque de la formation du GMPc n'est pas potentialisée par l'absence de Mg^{++} extracellulaire et n'est pas inhibée par l'APV ou le MK-801 (tableau 1). L'acide domoïque (CE_{50} = 3-5 μM) semble environ dix fois plus puissant que l'acide kaïnique[19]; il fait augmenter la concentration de GMPc d'environ 100 fois par rapport aux concentrations de base. L'acide quisqualique, qui ne stimule pas la production de GMPc[7,19] mais s'oppose plutôt à l'action de l'acide kaïnique[7], est un inhibiteur puissant d'une telle augmentation par l'action de l'acide domoïque (Novelli et coll., en préparation).

Les AAE sont des neurotoxines puissantes. L'acide glutamique est considéré comme une neurotoxine endogène potentielle du cerveau[2,13,17,22,34]. L'acide glutamique et l'acide aspartique, ingérés avec les aliments qui en contiennent, même dans un régime normal, peuvent constituer une source de neurotoxicité[23,26]. D'autres AAE, comme l'acide domoïque, peuvent se trouver accidentellement dans l'alimentation, provoquer des effets neurotoxiques et même la mort[8,35]. La neurotoxicité des AAE pourrait faire intervenir les deux types de récepteurs que nous avons décrits.

Dans les grains du cervelet en culture primaire utilisés comme système expérimental pour l'évaluation de la neurotoxicité des AAE, l'effet toxique engendré par les agonistes des récepteurs, comme l'acide glutamique et l'acide quinolinique, fait intervenir le RAAE de type NMDA[20]. En concentrations millimolaires, dans un tampon expérimental décrit ailleurs[20], il est limité par la concentration physiologique de Mg^{++}(1 mM) et par les concentrations normales d'adénosine-triphosphate (ATP)[20]. Cependant, une réduction de la disponibilité du glucose et la diminution consécutive de la charge

énergétique (C.E.), définie comme le rapport entre les nucléotides adénosine-triphosphate, adénosine-diphosphate et adénosine-monophosphate[20], permettent l'apparition de manifestations neurotoxiques par suite de l'exposition à des concentrations même micromolaires d'agonistes du récepteur de NMDA[20]. Le facteur qui favorise la toxicité au niveau du RAAE de type NMDA semble être la diminution du blocage voltage-dépendant par le Mg^{++} du canal correspondant à ce récepteur par abaissement du niveau énergétique. On peut produire un effet semblable en utilisant des agents qui bloquent la phosphorylation oxydative, comme le cyanure de potassium (KCN), ou des agents qui bloquent la pompe à sodium et à potassium, comme la ouabaïne, ou encore par l'incubation de la culture cellulaire en milieu anoxique. Dans toutes ces conditions expérimentales, on peut inverser la neurotoxicité par l'utilisation d'antagonistes du RAAE de type NMDA, comme l'APV ou le MK-801[20]. Comme on peut s'y attendre, la neurotoxicité provoquée par les agonistes du NMDA est potentialisée par l'élimination du Mg^{++} du tampon d'incubation (tableau 2). L'élimination simultanée du glucose et du Mg^{++} extracellulaire permet une manifestation, qui est fonction du temps, de la neurotoxicité par les agonistes du récepteur NMDA, à des concentrations aussi faibles que celles qui stimulent la formation de GMPc, soit 25 µM (fig. 3A).

Nous avons induit la neurotoxicité par l'intermédiaire du RAAE de type non-NMDA en utilisant des AAE exogènes, comme l'acide kaïnique et l'acide domoïque. La neurotoxicité par des concentrations micromolaires de ces composés s'est manifestée rapidement en l'absence de glucose (fig. 3B) et, contrairement à la neurotoxicité induite par les agonistes du récepteur NMDA, n'a pas été potentialisée par l'élimination du Mg^{++} du tampon expérimental (tableau 2). L'acide domoïque s'est révélé environ 10 fois plus neurotoxique que l'acide kaïnique (fig. 3B); il produit des effets neurotoxiques à des concentrations aussi faibles que celles qui stimulent la formation de GMPc (1 µM).

En l'absence de glucose, la neurotoxicité des AAE est fonction du temps et de la dose, mais frappe de manière irréversible tous les neurones de la culture. On ne peut donc ainsi quantifier la survie des neurones. Ce résultat a été obtenu par une longue exposition (24 h) aux AAE dans le milieu de culture. Les grains du cervelet pouvant survivre en culture primaire pendant plus d'un mois, il est possible de mesurer la toxicité des AAE à partir d'un niveau constant d'activités neuronales (Novelli et coll., en préparation). L'acide glutamique et l'acide domoïque sont à peu près équipotents pour ce qui est de la neurotoxicité (acide glutamique : CE_{50} = 11 µM; acide domoïque CE_{50} = 7,5 µM). Néanmoins, la neurotoxicité de l'acide glutamique peut être neutralisée par l'APV et le MK-801, mais non par l'acide quisqualique, tandis que la toxicité de l'acide domoïque n'est que partiellement neutralisée par l'APV et le MK-801 et n'est complètement neutralisée que par le quisqualate, qui serait également un antagoniste de la neurotoxicité induite par l'acide kaïnique[15].

Dans ces conditions expérimentales, l'extrait de «moules toxiques» contenant l'acide domoïque s'est révélé environ 10 fois plus neurotoxique que l'acide domoïque seul. Ce résultat inattendu fait dire que la neurotoxicité n'est pas attribuable uniquement à l'action de l'acide domoïque. En fait, elle n'a été complètement neutralisée qu'en présence simultanée d'APV et de quisqualate. Ce résultat peut s'expliquer si l'on suppose la présence d'au moins un autre AAE[4,25,26] agissant, comme neurotoxine, sur le RAAE de type NMDA, en plus de l'acide domoïque dont la présence est déjà connue et qui agit sur le RAAE de type non-NMDA. Cette hypothèse est appuyée expérimentalement par le fait que l'extrait de moules non toxiques s'est effectivement révélé neurotoxique pour les grains en culture primaire et que cet effet est complètement neutralisé par les antagonistes du récepteur NMDA. La possibilité que des agonistes du récepteur NMDA, normalement présents dans l'extrait de moule[4,25,26], et l'acide domoïque puissent avoir une action synergique a été posée par la mesure de la formation de GMPc comme indice biochimique de l'activation des RAAE. L'extrait de moules non toxiques est légèrement efficace pour augmenter les concentrations de GMPc (à environ quatre fois les chiffres de base) dans les grains du cervelet en culture primaire dans un tampon d'incubation contenant du Mg^{++} (1 mM). Toutefois, le même extrait provoque une forte augmentation (environ 70 fois plus que la valeur de base) des concentrations de GMPc intracellulaire en l'absence de Mg^{++}. L'acide domoïque à faible concentration (2,5 µM) produit une stimulation moindre (environ 10 fois par rapport à la valeur de base) mais significative de la formation de GMPc en présence de Mg^{++}. L'addition d'acide domoïque (2,5 µM) à l'extrait de moules non toxiques, en présence de Mg^{++}, provoque la formation de GMPc dans la même mesure que l'élimination du Mg^{++}. Ces résultats indiquent que de petites quantités d'acide domoïque peuvent potentialiser l'action des agonistes du récepteur de NMDA présents dans les moules, en réduisant le blocage par le Mg^{++} du canal correspondant au récepteur NMDA. Nous sommes toujours en train d'étudier les effets neurotoxiques de l'action combinée de petites quantités d'acide domoïque et d'agonistes du récepteur NMDA présents dans les moules non toxiques. D'après nos observations préliminaires et les résultats signalés ici, nous proposons un modèle pour comprendre l'effet neurotoxique de l'acide domoïque dans les moules (fig. 4).

Nous pensons que l'acide domoïque peut affecter simultanément les terminaisons nerveuses présynaptiques et postsynaptiques. Au niveau des terminaisons présynaptiques, il peut entraîner une dépolarisation et, ainsi, causer la libération d'AAE. Il peut également dépolariser les terminaisons postsynaptiques, réduisant ainsi le blocage voltage-dépendant par le Mg^{++} au niveau du récepteur de NMDA. Cet effet de l'acide domoïque permet une plus grande activité dépolarisatrice par les agonistes du récepteur NMDA libérés par les terminaisons présynaptiques. Des manifestations gastro-intestinales comme celles qui ont été signalées[8] pourraient vraisemblablement être à l'origine des concentrations sanguines anormalement élevées d'acide glutamique et d'acide aspartique, abondants dans les moules[4,25,26]. Par conséquent, des quantités non physiologiques d'acide aspartique et d'acide glutamique peuvent

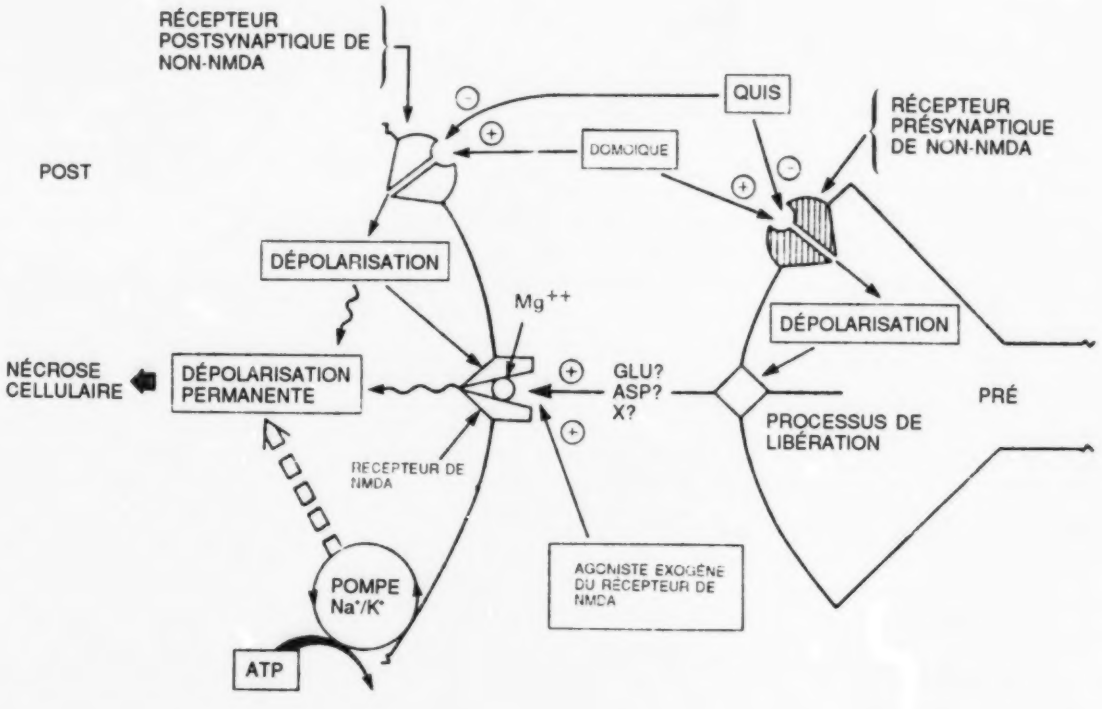
atteindre le système nerveux central et renforcer la dépolarisation au niveau des terminaisons postsynaptiques. Ces dépolarisations peuvent devenir sérieuses si les concentrations d'ATP sont faibles et si l'efficacité de la pompe à sodium et à potassium est réduite[20], et aboutir à la nécrose neuronale.

En conclusion, les grains du cervelet en culture primaire sont un système précieux pour comprendre la physiologie et la pathologie liées à la neurotransmission par les AAE et connaître la portée des synergismes potentiellement neurotoxiques entre des composés présents dans le milieu, comme nous venons de l'exposer.

Les extraits de moules ont été préparés à partir de moules non toxiques et de moules toxiques, selon la méthode suivante : les moules ont été écaillées, homogénéisées dans un Omnimixer Sorvall à vitesse maximale et l'homogénat a été lyophilisé. Pour le dosage de l'acide domoïque, des moules lyophilisées (245 mg) ont été mises en suspension dans l'eau distillée (30 mL) et conservées à 70 °C pendant 10 minutes, avec agitation. Après refroidissement à la température de la pièce, le mélange a été versé dans l'alcool éthylique absolu (60 mL) et centrifugé dans une centrifugeuse de table. Le surnageant clair a été évaporé jusqu'à environ 15 mL dans un évaporateur rotatif à température de la pièce et le volume du résidu a été ajusté à 25 mL dans une fiole jaugée. Une fraction de cette solution a été diluée à 1:5 et utilisée pour le dosage de l'acide domoïque par CLHR, selon la méthode antérieurement décrite par Quilliam, M.A., Sim, P.G., McCulloch, A.W. et McInnes, A.G., *Determination of domoic acid in shellfish tissue by high-performance liquid chromatography*, Conseil national de recherches du Canada, Rapport technique n° 55 du Laboratoire de recherche de l'Atlantique, NRCC 29015. Brièvement, une colonne Whatman Partisil ODS II de 10 µm (25 cm x 4,6 mm) a été éluée (1 mL/min) avec de l'acétonitrile en solution aqueuse à 12,5 %, après ajustement du pH 2,5 avec de l'acide phosphorique.

On a utilisé un détecteur de longueur d'onde variable Schoefel, réglé à 242 nm, et un spectrophotomètre à canaux multiples HP 8452A, balayant de 200 à 300 nm toutes les 5 secondes. Les acides aminés libres ont été extraits avec du HCl 0,1 N, transformés en dérivés avec de l'OPA et mesurés par chromatographie en phase liquide à haut rendement par A. Stehouwer, *Research and Productivity Council*, Fredericton, N.-B., Canada, selon la méthode de Hill, D.W., Walters, F.H., Wilson, T.D., Stuart, J.D., Anal. Chem. 51, (1979), 1338-1341. Les moules toxiques utilisées dans cette étude contenaient les acides aminés excitateurs suivants (en mg/g de poids sec) : acide domoïque = 2, acide aspartique = 5, acide glutamique = 2. Chez les moules non toxiques, l'acide domoïque était non décelable. Pour les expériences de culture tissulaire, on a remis en suspension 500 mg de moules lyophilisées dans 50 mL d'eau distillée, on a chauffé le tout à 70 °C pendant 10 min et centrifugé à 30 000 g pendant une

Figure 4
Schéma hypothétique des événements aboutissant à la neurotoxicité des acides aminés excitateurs†



†L'acide domoïque, présent dans les moules toxiques, peut atteindre le système nerveux central et causer la libération d'acides aminés excitateurs endogènes provenant des terminaisons présynaptiques. L'acide domoïque peut également agir sur les terminaisons postsynaptiques, facilitant ainsi l'action des acides aminés excitateurs provenant soit des terminaisons présynaptiques, soit de sources exogènes (dans le cas présent, l'acide aspartique et l'acide glutamique présents normalement dans les moules). On trouvera une description plus complète dans le texte.

heure à 40 °C. Le surnageant a été lyophilisé et l'échantillon a été reconstitué avec de l'eau distillée (6,4 mL). Le pH de la solution a été ajusté à 7,4. La concentration finale d'acide domoïque, d'acide glutamique et d'acide aspartique dans l'échantillon de moules toxiques a été calculée à partir des valeurs signalées ci-dessus.

Références

1. Biscoe TJ, Evans RH, Headley PM, Martin M, Watkins JC. *Domoic and quisqualic acids as potent amino acid excitants of frog and rat spinal neurones*. Nature 1975; 255: 166-167.
2. Coyle JT, Schwarcz R. *Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea*. Nature 1976; 263: 244-246.
3. Cull-Candy SG, Usowicz MM. *Multiple-conductance channels activated by excitatory amino acids in cerebellar neurons*. Nature 1987; 325: 525-528.
4. Felbeck H, Wiley S. *Free D-amino acids in the tissues of marine bivalves*. Reference Biol Bull 1987; 173: 252-259.
5. Gallo V, Ciotti MT, Aloisi F, Levi G. *Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture*. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 7919-7923.
6. Gallo V, Suergiu R, Giovannini C, Levi G. *Glutamate receptor subtypes in cultured cerebellar neurons: modulation of glutamate and γ-aminobutyric acid release*. J Neurochem 1987; 49: 1801-1809.
7. Gallo V, Giovannini C, Levi G. *Quisqualic acid modulates kainate responses in cultured cerebellar granule cells*. J Neurochem 1989; 52: 10-16.
8. Glavin GB, Pinsky C, Bose R. *Mussel poisoning and excitatory amino acid receptors*. Trends Neurosci 1989; 10,15.
9. Ito M. *The cerebellum and neural control*. New York: Raven, 1983.
10. Jahr CE, Stevens CF. *Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons*. Nature 1987; 325: 522-525.
11. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. *Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurons*. Nature 1984; 309: 261-263.
12. Mayer ML, Westbrook GL. *The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system*. Prog Neurobiol 1987; 28: 197-276.
13. Maragos WF, Greenamyre JT, Penney JB, Young AB. *Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis*. Trends Neurosci 1987; 10: 59-61.
14. McCaslin PP, Morgan WW. *Cultured cerebellar cells as an in vitro model of excitatory amino acid receptor function*. Brain Res 1987; 417: 380-384.
15. McCaslin PP, Smith TG. *Quisqualate, high calcium concentration and zero chloride prevent kainate-induced toxicity of cerebellar granule cells*. Eur J Pharmacol 1988; 152: 341-346.
16. MacDermott AB, Mayer ML, Wesbrook GL, Smith SJ, Barker JL. *NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones*. Nature 1986; 321: 519-522.
17. McGeer EG, McGeer PL. *Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids*. Nature 1976; 263: 517-519.
18. Nicoletti F, Wroblewsky JT, Novelli A, Alho H, Guidotti A, Costa E. *The activation of inositol phospholipid metabolism as a signal-transducing system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells*. J Neurosci 1986; 6: 1905-1911.
19. Novelli A, Nicoletti F, Wroblewski JT, Alho H, Costa E, Guidotti A. *Excitatory amino acid receptors coupled with guanylate cyclase in primary cultures of cerebellar granule cells*. J Neurosci 1987; 7: 40-47.
20. Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC. *Glutamate becomes neurotoxic via the NMDA receptor when intracellular energy levels are reduced*. Brain Res 1988; 451: 205-212.
21. Nowak L, Bregestovski P, Herbet A, Prochiantz A. *Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons*. Nature 1984; 307: 462-465.
22. Olney JW. *Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate*. Science 1969; 164: 719-721.
23. Olney JW. *Excitotoxic food additives: functional teratological aspects*. Prog Brain Res 1988; 73: 283-294.
24. Schousboe A, Drejer J, Hansen GH, Meier E. *Cultured neurons as model systems for biochemical and pharmacological studies on receptor:3 for neurotransmitter amino acids*. Dev Neurosci 1985; 7: 252-262.
25. Shunway SE, Gabbott PA. *The effect of fluctuating salinity on the concentrations of free amino acids and ninhydrin-positive substances in the adductor muscles of eight species of bivalve molluscs*. J Exp Mar Biol Ecol 1977; 29: 131-150.
26. Skurray GR, Pucar N. *L-glutamic acid content of fresh and processed foods*. Food Chemistry 1988; 27: 177-180.
27. Somogyi P, Halasy K, Somogyi J, Storm-Mathisen J, Ottersen OP. *Quantification of immunogold labelling reveals enrichment of glutamate in mossy and parallel fibre terminals in cat*. Neurosci 1986; 19: 1045-1050.
28. Stevens CF. *Are there two functional classes of glutamate receptors?* Nature 1986; 322: 210-211.
29. Sugiyama H, Ito I, Hirono C. *A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism*. Nature 1987; 325: 531-533.
30. Tang CM, Dichter M, Morad M. *Quisqualate activates a rapidly inactivating high conductance ionic channel in hippocampal neurons*. Science 1989; 243: 1474-1477.

31. Thangnipon W, Kingsbury A, Webb M, Balazs R. *Observations on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurons and astrocytes*. Dev Brain Res 1983; 11: 177-189.

32. Wong EHF, Kemp JA, Priestly T, Knight AR, Woodruff GN, Iverson LL. *The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist*. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 7104-7108.

33. Wood PL, Richard JW, Pilapil C, Nair NPV. *Antagonists of excitatory amino acids and cyclic guanosine monophosphate in cerebellum*. Neuropharmacology 1982; 21: 1235-1238.

34. Young AB, Greenamyre JT, Hollingsworth Z, Albin R, D'Amato C, Shoulson I, Penney JB. *NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease*. Science 1989; 241: 981-983.

35. Zaczek R, Coyle JT. *Excitatory amino acid analogues: neurotoxicity and seizures*. Neuropharmacology 1982; 21: 15-26.

Discussion

Question provenant de la salle : Vous avez dit que l'inhibition de la pompe à sodium potentialise la neurotoxicité du glutamate. Est-ce que ce même phénomène a été observé dans le cas de l'acide domoïque?

A. Novelli : Ce que nous croyons qu'il arrive au début pour le soulagement du blocage par le magnésium au niveau du canal NMDA, c'est une inhibition de la pompe à sodium et à potassium par une faible concentration d'ATP. Ainsi, un faible débit de la pompe à sodium et à potassium permettrait une lente dépolarisation des cellules qui soulage le blocage par le magnésium. C'est alors que le glutamate se mettrait à l'œuvre. Évidemment, l'acide domoïque n'a pas besoin de cette première étape. L'intoxication de la pompe à sodium et à potassium par une faible concentration d'ATP influera sur la capacité spectaculaire des cellules de survivre après l'une ou l'autre de ces stimulations, par le glutamate ou l'acide domoïque. Par conséquent, oui, l'action de l'acide domoïque est affectée et la neurotoxicité est accrue par l'une ou l'autre de ces conditions.

Commentaire provenant de la salle : Je crois qu'il s'agit d'un point très important si l'on essaie d'expliquer les facteurs déclenchants. Par exemple, les malades qui prennent des glycosides cardiaques traditionnels pour le traitement d'une arythmie et qui consomment des moules toxiques auront de graves difficultés. Deuxièmement, d'autres agents qui inhibent également de façon marquée la pompe à sodium, p. ex. le vanadium, pourraient également être des candidats possibles comme facteurs déclenchants.

G. Debonnel : Vous venez de mentionner la stimulation des concentrations de GMPc. Vous avez observé un effet du produit NK21 sur l'acide kaïnique, mais non sur l'acide domoïque. Pourriez-vous expliquer cette situation; est-ce que l'acide kaïnique agit sur les récepteurs de NMDA?

A. Novelli : Non; comme je l'ai dit, l'effet du NK21 sur la stimulation de l'acide kaïnique n'est pas lié à la dose. Je ne pouvais contrer davantage l'effet de l'acide kaïnique en augmentant la concentration du NK21 jusqu'à, je crois, 100 µM. Par conséquent, je crois qu'une des possibilités, c'est que l'acide domoïque libère du glutamate; le glutamate peut agir de cette façon. Mais il pourrait s'agir d'une certaine forme d'interférence dans le canal, étant donné que nous ne savons pas si le canal est le même. Certains pensent que le canal peut être le même ou semblable, ce qui voudrait dire que peut-être l'acide domoïque est plus efficace.

C. Pinsky : Avez-vous dit que l'action de l'acide domoïque est indépendante de la présence ou de l'absence du magnésium?

A. Novelli : Oui elle l'est, parce que l'absence de magnésium diminue l'effet de l'acide domoïque plutôt que de le potentialiser, comme c'est le cas du glutamate.

C. Pinsky : Mais pourquoi attribuez-vous cela aux effets du magnésium sur l'enzyme, alors que l'acide kaïnique affecte le même enzyme que l'acide domoïque?

A. Novelli : Il s'agit d'une très bonne question et je ne connais pas la bonne explication. Mais je peux spéculer à partir de l'expérience que j'ai acquise en travaillant avec la GMP-cyclase. Si vous utilisez l'ionophore calcique, par exemple, vous pouvez provoquer la même stimulation de la GMP-cyclase. Mais si vous ôtez le magnésium du milieu extracellulaire, la stimulation que vous pouvez produire est réduite de 50 % et même plus par rapport à celle que vous pouvez obtenir en présence de magnésium. Ainsi, peut-être que le magnésium est nécessaire pour l'activation de la cyclase et, d'une manière que nous ignorons, s'échappe des cellules. Je ne sais pas comment, mais l'ionophore est une navette naturelle pour le calcium et le magnésium. Dans le cas de l'acide domoïque, j'ignore ce qui arrive, mais je suppose qu'une partie du magnésium s'échappe de l'intérieur vers l'extérieur, là où il n'y a pas de magnésium.

18. *Modèle expérimental sensible pour l'étude du comportement de souris intoxiquées par les extraits de moules contaminées – antidotes possibles*

R. Bose, C. Pinsky, et G.B. Glavin

Résumé

La récente apparition du syndrome «amnésiant» d'intoxication par les moules, attribuée à la contamination par l'acide domoïque de moules comestibles, a causé plusieurs décès; de nombreux survivants souffrent depuis de troubles de mémoire caractéristiques. Nous avons administré à des souris Swiss-Webster un extrait complet de moules (WMX) et un extrait de l'hépatopancréas de moules, celui-ci étant le principal lieu d'accumulation de l'acide domoïque dans les moules. Nous avons observé un syndrome typique caractérisé par l'apathie, un grattage stéréotypé, des convulsions et la mort. Les souris non sevrées sont de trois à quatre fois plus sensibles à la toxicité du WMX que les souris adultes. L'acide kynurénique (KYN), un antagoniste endogène non sélectif des excitotoxines, apporte une protection significative contre la toxicose après le déclenchement de la maladie par l'extrait de moule. Cette observation souligne la possibilité d'utiliser cet acide ou des composés voisins dans la thérapie des intoxications par des excitotoxines. Comme suite logique à cette notion, nous examinons la possibilité de faire intervenir du KYN endogène contre l'intoxication par le domoate chez nos souris. La durée de son effet protecteur est prolongée par le probénécide, un agent pharmacologique qui bloque le transport des acides organiques, et par le tryptophane, un précurseur de KYN endogène. Nous essayons également des anticonvulsivants classiques (la phénytoïne et l'ethosuximide), ainsi que le dextrométorphan en doses anti-excitoxines.

Ce modèle semble prometteur pour la mise au point d'une épreuve biologique rapide, sensible, fiable et peu coûteuse pour le dépistage de la contamination par des excitotoxines de lots de moules du commerce. Il y a lieu de considérer l'acide kynurénique et le dextro-métorphan comme antidotes à des fins thérapeutiques chez les victimes actuelles et pour le traitement d'une toxicose au domoate pouvant survenir dans l'avenir chez nous ou à l'étranger.

Introduction

La récente vague d'intoxications par des moules (*Mytilys edulis*) contaminées par l'acide domoïque dans l'est du Canada[1,17,26], non seulement a laissé dans son sillage des victimes souffrant de troubles de mémoire persistants (J. Teitelbaum, Institut neurologique de Montréal, communication personnelle) et dont l'avenir est incertain, mais également la perspective alarmante d'une récidive dans notre pays ou à l'étranger. L'absence d'un antidote convenable contre cette toxicose sans précédent soulève également des inquiétudes.

Dans notre laboratoire nous nous sommes penché sur ces deux aspects du problème. Au cours des derniers mois, nous avons mis au point un essai sur des souris qui est rapide, sensible et fiable afin de détecter les traces de contamination par des excitotoxines dans les extraits de moules. Nous avons également essayé des agents pharmacologiques qui pourraient servir comme antidotes dans ce modèle de toxicose. Dans nos rapports antérieurs[16,27], nous avons démontré que l'acide kynurénique assure une grande protection contre la toxicité des extraits de moules contaminées par l'acide domoïque sur le système nerveux et le tube digestif. Il est intéressant de noter que cet effet protecteur survient dans un délai qui permettait l'administration efficace de l'antidote après le déclenchement de la toxicose par le domoate. Dans le présent travail, nous étudions l'effet protecteur du KYN endogène après augmentation pharmacologique de sa concentration dans le cerveau. Nous examinons également l'effet de composés anticonvulsivants de référence et du dextrométorphane, un autre antagoniste des excitotoxines.

Matériel et méthodes

Animaux: Souris Swiss-Webster (Charles River, mâles adultes: poids corporel moyen de 25 g; souris non sevrées des deux sexes âgées de 15 jours: poids corporel moyen de 5 g) gardées dans un vivarium à température, lumière et humidité contrôlées, avec accès libre à la nourriture et à l'eau.

Extraits de moules

a) Extrait complet de moules (WMX): Un extrait acide aqueux de moules entières sans leur coquille a été préparé, à la Section de biochimie d'Ottawa, Santé et Bien-être social Canada, en suivant essentiellement le même protocole que celui prescrit pour la recherche de la toxine paralysante des mollusques[33]. Cette suspension acide (pH de 3,3 à 3,6) contenant 0,15 mg d'acide domoïque mL est administrée par voie intrapéritonéale (i.p.) aux souris adultes et jeunes, à des doses comprises entre 5,9 et 40 mL/kg.

b) Extrait d'hépantopancréas de moules (MHX): L'hépatopancréas (17,5 g) de moules toxiques est disséqué et homogénéisé avec 30 mL d'eau dans un appareil Sorvall Omnimixer, modèle 963c, à la vitesse «10» durant 30 secondes. L'homogénat est alors centrifugé à 3000 tours par minute, ce qui permet d'obtenir (avec les lavages) une quantité totale d'homogénat de 60 mL. On en utilise une aliquote (1 mL) pour déterminer la concentration d'acide domoïque, la quantité restante étant lyophilisée. L'acide domoïque est déterminé par chromatographie en phase liquide à haut rendement selon la technique de Bates et coll.[2]. Le MHX lyophilisé contient 8,5 mg d'acide domoïque/g de poids sec.

On le suspend dans l'eau pour injection à des concentrations variant entre 7,5 et 30,0 mg de poids sec/mL. Le pH final est 6,8; le volume d'injection i.p. est de 10 mL/kg, la dose estimée d'acide domoïque variant de 0,64 à 2,55 mg/kg.

Autres agents pharmacologiques

Toutes les solutions qui suivent sont injectées au même volume de 10 ml/kg de poids corporel.

Acide kynurénique: Le KYN (Sigma) est dissous dans le soluté physiologique (SAL) en ajoutant 1 mM de NaOH. On neutralise la solution par 1 mM de HCl avant d'ajouter du sérum physiologique pour obtenir une concentration finale de 30 ou 60 mg/ml.

Le probénicide (PROB, Sigma) est mis en solution selon le même protocole d'alcalination, de neutralisation et de dilution pour obtenir une concentration finale de 10 ou 20 mg/mL.

Le l-tryptophane (TRYP, Sigma) est dissous dans le soluté physiologique à la concentration de 10 mg/mL.

La phénytoïne (PHEN, Sigma) est dissoute dans le soluté à la concentration de 1,5 mg/mL.

L'éthosuximide (ETSX, Parke-Davis) est dissous dans le soluté à la concentration de 20 mg/mL.

Le **dextrométorphane** (DEXM, Sigma) est dissous dans le soluté à la concentration de 2 mg/mL.

Protocole expérimental

Rapport dose-mortalité: On administre en i.p. à des souris adultes soit le WMX à des volumes compris entre 5,3 et 60,0 ml/kg, soit l'albumine du sérum de boeuf à la dose de 40 ml/kg. On donne de 5 à 30 ml/kg de WMX par la même voie à des souris non sevrées. La mortalité est enregistrée sur 24 h. Dans une autre expérience, on injecte à de jeunes souris, toujours en intra-péritonéale, des doses de MHX correspondant à une quantité comprise entre 75 et 300 mg de matière sèche, soit de 0,64 à 2,55 mg d'acide domoïque, par kilo. On consigne la survenue du grattage, des convulsions et du décès chez ces animaux, ainsi que les latences en minutes avant l'apparition de la première crise convulsive et le décès. On garde les survivantes sous surveillance continue pendant 4 h, vu notre expérience antérieure avec le WMX où tous les décès sont survenus dans ce délai[7]. On étudie aussi les interactions dans les effets des divers agents.

Observation des comportements: Elle se fait sur 4 h après injection de WMX ou de MHX. Les signes comportementaux neuro-végétatifs et moteurs, la réactivité, les stéréotypies, les convulsions (présence et type), la dyspnée, l'incoordination) sont notés.

Analyse statistique: Toutes les données sont présentées soit sous forme de fréquence de survenue, soit sous forme de latence moyenne ± écart-type. On les analyse par la méthode ANOVA suivie du test de Duncan pour les comparaisons multiples. Les fréquences sont comparées par χ^2 avec la correction de Yates.

Résultats

Comportement

Les signes comportementaux observés sont comparables chez les souris adultes et les jeunes souris auxquelles on a injecté soit du WMX, soit du MHX. Ces signes sont présentés au tableau 1. Le grattage, très caractéristique, varie en intensité, s'amplifiant généralement dans le temps. Ce comportement stéréotypique est habituellement suivi d'ataxie et de convulsions cloniques des membres se généralisant souvent. On observe aussi parfois des convulsions toniques. Beaucoup des animaux ainsi atteints tombent dans un état de mal épileptique prolongé: mouvements cloniques de peu d'amplitude persistant presque toujours jusqu'à la mort de l'animal. Celle-ci est précédée de peu par des signes évidents de gêne respiratoire: respiration lente et irrégulière, halètement et, parfois, une cyanose intense.

Le WMX et le MHX montrent tous deux un très net rapport dose-mortalité chez toutes les souris (figure 1 et tableau 2). Le taux de survenue des convulsions et la période de latence de la première crise sont toutes deux en corrélation avec la dose de MHX: le premier passe de 20 à 100 p. 100, la moyenne de la seconde de 83 à 18 minutes, les doses i.p. variant de 75 à 300 mg/kg. Aucun décès n'est observé chez les souris ayant reçu des doses de MHX inférieures ou égales à 150 mg/kg.

Expériences sur l'interaction des médicaments

Expérience I (tableau 2 gr. IV et tableau 3 gr. A et B): Le traitement au KYN effectué 15 minutes avant l'injection de MHX ne fournit aucune protection. Cependant, les souris auxquelles PROB et KYN ont été administrés respectivement 60 min et 15 min avant l'injection du MHX (200 mg/kg), montrent un plus faible taux de survenue de convulsions et une latence nettement plus grande avant leur apparition. La mortalité dans ce cas est très légèrement réduite comparativement au groupe ayant reçu seulement le MHX (tableau 2, gr. IV). La latence avant le décès est plus longue pour le groupe PROB-KYN-MHX que pour les groupes SAL-KYN-MHX et MHX.

Expérience II (tableau 2 gr. V et tableau 3 gr. E à G): Les souris auxquelles on a administré SAL, SAL, KYN et MHX (250 mg/kg) ne sont pas protégées de façon significative, bien que la latence avant le décès soit ici de 40 p. 100 plus longue que dans le groupe correspondant de souris n'ayant reçu que MHX (tableau 2, gr. V). Les souris traitées à TRYP et à PROB avant l'injection de MHX (250 mg/kg) ne sont pas protégées, comparativement au groupe auquel on n'a injecté que MHX. Le groupe traité à TRYP, PROB, KYN et MHX, montre une latence prolongée de façon significative avant l'apparition des convulsions et le décès, comparativement au groupe n'ayant reçu que MHX.

Expérience III (tableau 2, gr. VI, et tableau 3, gr. C et D): En inversant l'ordre d'injection de KYN et de MHX, le traitement n'a eu d'influence ni sur les convulsions, ni sur le grattage, ni sur la létalité. Cependant, la latence avant le décès dans le groupe traité au KYN est plus de deux fois plus longue chez les souris ayant reçu le MHX seul (300 mg/kg).

Les souris observées après l'injection de PROB seul, ou de TRYP suivi de PROB, montrent des crises de grattage moins intenses que celles observées après l'injection de MHX. Elles ne réagissent ni au toucher ni à la pression et présentent un état stuporeux et la perte du réflexe de redressement. Leur respiration est superficielle mais régulière; comme elles sont froides au toucher, on utilise des lampes incandescentes pour les protéger contre l'hypothermie.

Expérience IV (tableau 4): Administrés 20 minutes avant le WMX (1 ml/souris), la phénytoïne et l'éthosuximide prolongent tous deux de façon significative la latence avant les convulsions et le décès, sans en modifier le taux. Cependant, administrée 60 minutes avant le WMX, la phénytoïne prolonge de façon significative la latence avant les convulsions et le décès, contrairement à l'éthosuximide.

Lors d'expériences préliminaires, le dextrométorphane administré à la dose de 20 mg/kg, 60 minutes avant l'injection de MHX à la dose de 200 mg/kg protégeait de façon significative contre le décès (tableau 4). Quand on l'administre 42 minutes après l'injection de WMX, il ne donne aucune protection contre les divers effets toxiques (données non divulguées).

Discussion

Nous avons indiqué antérieurement[7] que le profil de l'action de WMX sur les compertements est semblable à celui signalé pour les analogues des aminoacides neuroexcitateurs (NEAA) chez la souris[11,31] et le rat[18], et qu'il comporte en outre la dépression du S.N.C. chez la souris traitée à WMX. À en juger par ses effets sur la souris, MHX possède le même profil. La différence de composition des deux extraits ne les empêche pas d'avoir les mêmes effets qualitatifs sur les comportements, qu'il est permis d'attribuer en grande partie à leur teneur en acide domoïque.

Nous avons trouvé que les jeunes souris sont de 3 à 4 fois plus vulnérables que les adultes aux effets toxiques de WMX. Cette variation de la sensibilité en fonction de l'âge ne doit pas être entièrement due à la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique à la période néonatale, l'acide domoïque étant soluble dans les lipides[5]; elle s'expliquerait aussi par les différences moléculaires entre le domoate et les autres sous-types de récepteurs d'aminoacides neuroexcitateurs[3].

Les réactions comportementales observées chez les souris Swiss-Webster non sevrées après administration i.p. de MHX ressemblent fort à celles décrites antérieurement[7] chez les souris jeunes et adultes auxquelles on avait administré WMX contaminé par l'acide domoïque: le grattage était très souvent observé chez les animaux ayant reçu la plus petite dose de MHX utilisée dans cette expérience, soit 75 mL/kg. Ceci correspond à l'injection de 4,5 µg d'acide domoïque dans un volume de 70 µl par 7 g de poids d'une souris non sevrée, soit 0,64 mg d'acide domoïque au kg. À cette dose, on observait le grattage chez 80 p. 100 des animaux et les convulsions chez 20 p. 100. Quant à WMX, il contient approximativement 0,15 mg d'acide domoïque par mL (valeur moyenne représentative). La dose de WMX ayant provoqué le grattage chez 80 p. 100 des jeunes souris est de 6,9 mL/kg, ce qui correspond approximativement à 1,04 mg d'acide domoïque/kg. On peut penser que la différence observée dans la quantité d'acide domoïque d'efficacité équivalente selon qu'on se sert de MHX ou de WMX (0,64 et 1,04 mg/kg respectivement) est dû à un rôle modulateur de leurs autres constituants qui pourrait être utilement exploré.

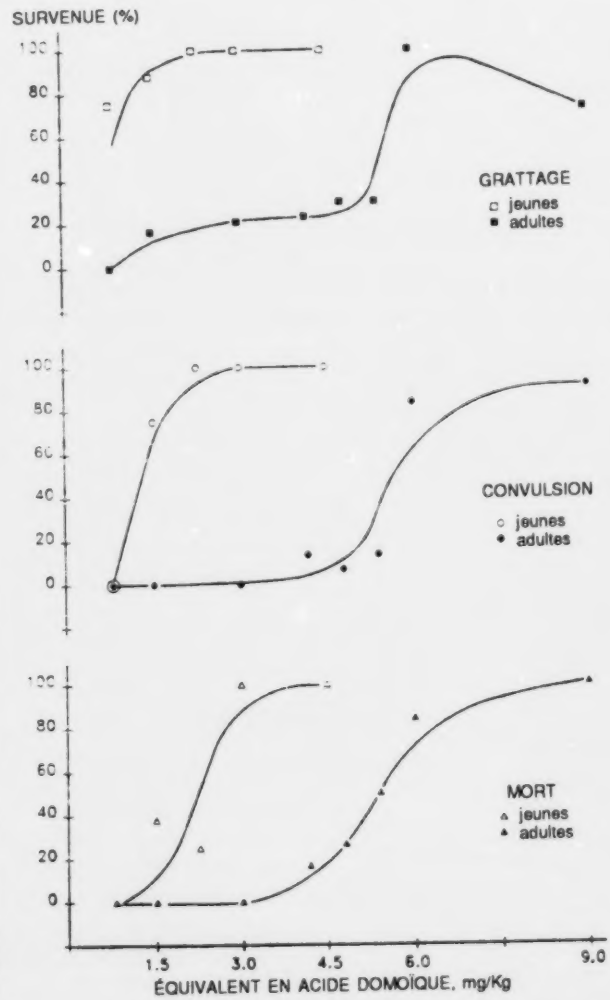
On devrait pouvoir tirer profit de ces observations en mettant au point un essai sur de jeunes souris pour faciliter la détection des traces de contamination par l'acide domoïque, en prenant le grattage comme paramètre comportemental. De plus grands volumes (jusqu'à 300 µl par souris non sevrée) de solutions plus diluées d'acide domoïque ou d'extrait de moules contaminées pourraient être injectés en i.p. On pourrait encore augmenter la sensibilité de l'épreuve en prenant un plus faible taux de survenue de grattage (p. ex., 50 p. 100) comme critère de réaction. Les limites inférieures de sensibilité seraient alors proches de 8 µg d'acide domoïque/mL, ce qui donnerait une sensibilité de trois à quatre fois plus grande que celle signalée récemment pour un essai de comportement chez des souris femelles adultes CD1[10]. Un tel essai sur la jeune souris serait une méthode simple, rapide et sûre pour l'examen à grande échelle de lots commerciaux de moules et le dépistage des agonistes des aminoacides neuroexcitateurs.

Nos résultats antérieurs[16,27] obtenus au moyen de WMX indiquent que KYN, un antagoniste non sélectif des récepteurs aminoacides excitateurs[15], protège la souris adulte contre les effets toxiques digestifs et nerveux (convulsions, mort), seulement s'il est administré de 30 à 90 minutes *après* l'extrait contaminé par l'acide domoïque. En effet, administré 30 minutes avant, il est inefficace, mais il assure une très grande protection contre les convulsions lorsqu'il est administré de 30 à 90 minutes après le WMX. Il protège de manière significative contre la létalité par WMX s'il est administré en i.p. à raison de 300 mg/kg de 45 à 90 minutes après WMX. À 600 mg/kg il assure une protection efficace ($p<0,05$) lorsqu'il est administré 28 minutes après WMX, alors qu'il était inefficace 13 minutes après[27]. Nos découvertes actuelles montrent que l'effet protecteur de KYN contre la toxicité de MHX chez les jeunes souris dépend également du moment d'administration. Une telle dépendance reflète peut-être un rapport chronologique entre l'activation du récepteur influencé par l'acide domoïque et celle du récepteur du glycocolle insensible à la strychnine, où l'on suppose que le KYN exerce principalement[19, 20] son antagonisme de la stimulation des récepteurs d'amino-acides neuroexcitateurs du sous-type NMDA. Cependant, il reste à déterminer dans quelle mesure un tel site glycocollique, ou peut-être même un antagonisme des aminoacides neuroexcitateurs dépendant de l'utilisation[34], intervient dans les intoxications neurologiques induites par l'acide domoïque ou les extraits de moules contaminées. Un autre facteur susceptible d'expliquer pourquoi l'action de KYN est brève et ne s'exerce qu'entre d'étroites limites de temps serait son excrétion rapide du cerveau[30] par le biais des mécanismes de transport des acides organiques. Moroni et coll.[24] ont démontré récemment une accumulation de KYN endogène dans le cerveau après administration de PROB, un médicament qui bloque la sortie des acides organiques du cerveau[25].
L'accumulation de KYN qui a dû survenir après l'administration de PROB dans la présente étude, aurait été encore augmentée par l'administration de TRYP, précurseur naturel de KYN endogène et d'autres composés biologiques importants[29].

Les souris auxquelles on a injecté TRYP et PROB, mais non KYN, ont un comportement ne différant que peu de celui des souris auxquelles on a injecté du MHX seul, ce qui donne à penser que le KYN endogène serait insuffisant pour protéger contre la toxines de moules. Un traitement associant TRYP et PROB, sans KYN exogène, pourrait effectivement être préjudiciable, car il en résulterait une accumulation d'acide quinolinique, une excitotoxine endogène[23,29] dont on a montré que c'est un convulsivant[21] capable de déterminer des lésions neuronales épargnant les axones, de la même manière que les acides kaïnique et iboténique[12,28].

Nous avons observé un grattage stéréotypé chez certaines des souris auxquelles on a injecté PROB seul. Le grattage revêt la même forme, en moins intense, que celui observé après l'administration des substances suivantes: extrait de moules toxiques[7], extrait d'hépatopancreas de moules (la présente étude); acide domoïque (notre laboratoire, non publié), et autres aminoacides neuroexcitateurs[11]. Le grattage induit par le PROB pourrait fort bien être dû à l'accumulation de l'acide quinolinique dans le cerveau. Bien que l'on ait montré que le KYN bloque la neurotoxicité de l'acide quinolinique[4,6,12,14,22], sa concentration dans le cerveau de la plupart des mammifères est presque cent fois moins importante que celle de l'acide quinolinique[24]. Au surplus, El-Defrawy et coll.[12] ont montré qu'à toutes fins pratiques une concentration équimolaire de KYN est nécessaire pour antagoniser les effets neurotoxiques d'une concentration donnée d'acide quinolinique.

Figure 1
Effets différentiels de WMX sur les taux exprimées en pourcentage du grattage, des convulsions et du décès chez des souris Swiss-Webster jeunes et adultes



Les doses de WMX sont présentées sous forme d'équivalents en acide domoïque. N = 6 à 19 souris (adultes) et 4 à 6 souris (non sevrées) pour chaque groupe selon la dose

Bien que le KYN endogène seul ne soit pas suffisant pour protéger contre la toxicité des moules contaminées par l'acide domoïque, on peut, par le TRYP, et le PROB ou le PROB seul, élargir les limites de temps entre lesquelles s'exerce l'action protectrice de KYN administré de façon exogène. Il n'est pas surprenant que la protection observée par nous ne soit pas complète – à savoir qu'il s'est agi surtout d'un retard de l'apparition des convulsions ou de la mort – puisque les doses de MHX étaient relativement élevées. Il pourrait être utile lors d'expériences ultérieures de recourir à des doses plus faibles d'extraits toxiques afin de mieux sonder les effets protecteurs des agents essayés. Bien qu'elles apparaissent généralement les unes après l'autre, les convulsions et la mort sont probablement dues à un effet toxique sur deux ou plusieurs systèmes centraux distincts. On expliquerait ainsi que la relation dose-réaction soit plus graduelle pour ce qui est des convulsions, que dans le cas de la mort dont la courbe de survenue est assez abrupte au-delà d'une certaine dose, et que le temps de latence avant la mort chute rapidement à mesure que la dose d'extrait toxique augmente. La cause de la mort semble manifestement due à des arythmies cardiaques comme nous l'avons démontré par l'extrême bradycardie chez les animaux sur le point de mourir. Les implications de ces phénomènes vont être explorées plus en profondeur dans notre laboratoire.

La phénytoïne et l'éthosuximide, deux antiépileptiques utilisés respectivement dans le traitement du grand mal et du petit mal, se sont avérés tous deux très peu efficaces pour retarder l'apparition des convulsions et de la mort provoquées par WMX. Dans les expériences préliminaires, le dextrométorphane, un antitussif communément utilisé montrant à fortes doses des propriétés antagonistes contre le glutamate et le NMDA[8,9,13,32], assure une grande protection contre la mort provoquée par MHX, pourvu qu'il soit administré avant les extraits de moules toxiques.

Remerciements

Ce travail a été subventionné par le Conseil de recherches médicales du Canada et la Société Alzheimer du Canada. Nous sommes très reconnaissants à I. Hynie, Laboratoire de

lutte contre la maladie, à Ottawa, Santé et Bien-être Canada, et à V. Zitko, Section de la chimie marine, Pêches et Océans. Ils nous ont fourni les extraits de moules toxiques, formulé d'utiles commentaires et donné des indications pertinentes sur les méthodes d'extraction de l'acide domoïque et sur sa concentration dans les extraits.

Références

1. ARL Shellfish Toxin Team. Conseil national de recherches Canada. *Solving the toxic mussel problem*. Canadian Chemical News, NRCC 29368, 1988; 15-17.
2. Bates SS, Bird CJ, Boyd RK, et coll. Conseil national de recherches Canada. *Investigations on the source of domoic acid responsible for the outbreak of amnesic shellfish poisoning (ASP) in Eastern Prince Edward Island*. Atlantic Research Laboratory, 1988; Technical Report 57, NRCC 29086.
3. Ben-Ari Y, Tremblay E, Berger M, Nitecka L. *Kainic acid seizure syndrome and binding sites in developing rats*. Dev Brain Res 1984; 14: 284-288.
4. Baninger RJ, Jhamandas K, Boegman RJ, El-Defrawy SR. *Kynurenic acid-induced protection of neurochemical and behaviourial deficits produced by quinolinic acid injections into the nucleus basalis of rats*. Neurosci Lett 1986; 68: 317-321.
5. Biscoe TJ, Evans RH, Headley PM, et coll. *Structure-activity relations of excitatory amino acids on frog and rat spinal neurones*. Br J Pharmacol 1976; 58: 373-382.
6. Boegman RJ, El-Defrawy S, Jhamandas K, Baninger RJ, Ludwin SK. *Quinolinic acid neurotoxicity in the nucleus basalis antagonized by kynurenic acid*. Neurobiology of Aging 1985; 6: 331-336.
7. Bose R, Glavin GB, Pinsky C. *Neurotoxicity and lethality of toxic extracts from Atlantic coast shellfish*. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatr 1989 (sous presse).
8. Choi DW. *Dextrorphan and dextromethorphan attenuate glutamate neurotoxicity*. Brain Res 1987; 403: 333-336.
9. Church J, Lodge D, Berry SC. *Differential effects of dextrorphan and levorphanol on the excitation of rat spinal neurons by amino acids*. Eur J Pharmacol 1985; 111: 185-190.
10. Connell BJ, Tasker RAR. *A new method of quantifying toxicity following systemic injections of EAA agonists in mice*. Proceedings of the joint meeting of American Physiological Society/American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. The Pharmacologist 1988; 30: A225, #150.9.
11. Crawford JM. *The effect upon mice of intraventricular injection of excitant and depressant amino acids*. Biochem Pharmacol 1963; 12: 1443-1444.
12. El-Defrawy S, Boegman RJ, Jhamandas K, Baninger RJ. *The neurotoxic action of quinolinic acid in the central nervous system*. Can J Physiol Pharmacol 1986; 64: 369-375.
13. Ferkany JW, Borosky SA, Clissold DB, Pontecarvo MJ. *Dextromethorphan inhibits NMDA-induced convulsions*. Eur J Pharmacol 1988; 151: 151-154.
14. Foster AC, Vezzani A, French ED, et coll. *Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid*. Neurosci Lett 1984; 48: 273-278.
15. Germano I, Pitts L, Meldrum B, et coll. *Kynurenate inhibition of cell excitation decreases stroke size and deficits*. Ann Neurol 1987; 22: 730-734.
16. Glavin G, Bose R, Pinsky C. *Kynurenic acid protects against gastroduodenal ulceration in mice injected with extracts from poisonous Atlantic shellfish*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 1989; 13: 569-572.
17. Gray C. *Mussel mystery: "The more you know, the more you don't know."* Can Med Assoc J 1987; 138: 350-351.
18. Jenner P, Marsden CD, Taylor RJ. *Behaviourial changes induced by the unilateral intrastriatal administration of glutamate analogues in the rat*. Brit J Pharmacol 1981; 72: 570.
19. Johnson JW, Ascher P. *Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons*. Nature 1987; 325: 529-531.
20. Kessler M, Baudry M, Terramani T, et coll. *Complex interactions between a glycine binding site and NMDA receptors*. Proc Soc Neurosci 1987; 13: 760.
21. Lapin IP. *Convulsant action of intracerebroventricularly administered l-kynurenine sulphate, quinolinic acid and other derivatives of succinic acid, and effects of amino acids: structure activity relationships*. Neuropharmacology 1982; 21: 1227-1233.
22. Lapin IP, Prakhie IB, Kiseleva IP. *Antagonism of seizures induced by the administration of the endogenous convulsant quinolinic acid into rat brain ventricles*. Neurol Trans 1986; 65: 177-185.
23. Moroni F, Lombardi G, Carla V, et coll. *The excitotoxin quinolinic acid is present and unevenly distributed in the rat brain*. Brain Res 1984; 295: 352-355.
24. Moroni F, Russi P, Lombardi G, et coll. *Presence of kynurenic acid in the mammalian brain*. J Neurochem 1988; 51: 177-180.
25. Neff NH, Tozer TN, Brodie BB. *Application of steady state kinetics to studies of the transfer of 5-hydroxyindoleacetic acid from brain to plasma*. J Pharmacol Exp Ther 1967; 158: 214-218.
26. Perl T, Bédard L, Remis R, et coll. *Intoxication following mussel ingestion in Montreal*. Can Dis Wkly Rep 1987; 13: 224-226.

27. Pinsky C, Glavin GB, Bose R. *Kynurenic acid protects against neurotoxicity and lethality of toxic extracts from contaminated Atlantic coast mussels*. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatr 1989; 13/3-4: 595-598.

28. Schwarcz R, Whetsell WO, Jr., Mangano RM. *Quinolinic acid: An endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain*. Science 1983; 219: 316-318.

29. Stone TW, Connick JH. *Quinolinic acid and other kynurenines in the central nervous system*. Neuroscience 1985; 15: 597-617.

30. Turski WA, Schwarcz R. *On the disposition of intrahippocampally injected II-kynurenic acid in the rat*. Proc Soc Neurosci 1987; 13: 1675.

31. Wood PL, Richard JW, Pilapil C, Nair NPV. *Antagonists of excitatory amino acids and cyclic guanosine monophosphate in cerebellum*. Neuropharmacology 1982; 21: 1235-1238.

32. Wong BY, Coulter DA, Choi DW, Prince DA. *Dextrorphan and dextromethorphan, common antitussives, are antiepileptic and antagonize N-methyl-D-aspartate in brain slices*. Neurosci Lett 1988; 85: 261-266.

33. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. Arlington, Va: Association of Official Analytical Chemists, 1984.

34. Kemp JA, Foster AC, Wong EHF. *Non-competitive antagonists of exitatory amino acid receptors*. Trends Neurosci 1987; 10: 294-298.

Discussion

A. Tasker, Charlottetown : Dr Bose, comme vous le savez nous avons travaillé sur à peu près les mêmes choses en ce qui a trait à l'élaboration d'un modèle murin, et je suis heureux de constater que votre modèle a une sensibilité à peu près équivalente au nôtre, et nous avons considéré un certain nombre d'autres aspects qui ressemblent à ce que vous avez fait; j'aimerais pouvoir partager votre enthousiasme au sujet de l'acide cynurénique. Hélas dans notre cas, nous ne trouvons absolument aucun indice d'un effet antagoniste de l'acide cynurénique à des concentrations de 200, 400 ou 600 mg/kg, que ce soit avant (30 et 15 minutes), en même temps ou après (15 ou 30 minutes), lorsqu'on compare au véhicule témoin, que ce soit dans le soluté physiologique ou dans des conditions comme celles que vous avez utilisées, pH 9 dans l'eau. Je me demandais si vous pouviez expliquer cette divergence.

R. Bose : Eh bien, dans nos expériences, nous avons trouvé que la fenêtre thérapeutique commençait en réalité à environ 45 minutes avec une faible dose d'acide cynurénique, et qu'elle durait jusqu'à 90 minutes après le début de l'administration; si vous avez arrêté à 30 minutes, il se peut très bien que vous ayez raté cet effet. À une dose plus élevée, c'est à 28 minutes, ce qui est plutôt proche. Il faut dire que cela peut jouer de deux ou trois minutes selon l'expérience.

A. Tasker : Eh bien, cela se pourrait, mais uniquement lorsqu'on considère les effets des doses élevées. Nous, nous avons utilisé 600 mg/kg d'acide cynurénique par 30 minutes après et nous avons enregistré des comportements qui permettent de détecter de manière fiable 20 µg d'acide domoïque chez la souris, ce qui est extrêmement faible comparativement aux quelque 100 µg que vous avez utilisés et même là, nous n'avons toujours pas vu d'effet protecteur. Je ne sais pas si les souris des Maritimes réagissant différemment ou quoi! L'autre question concerne l'utilisation du tryptophane exogène et je me demande comment vous pouvez dire qu'il s'agit d'une action qui s'exerce exclusivement sur l'acide cynurénique endogène, parce que, d'après ce que je sais, le tryptophane exogène aura plusieurs effets, y compris celui d'augmenter les concentrations de sérotonine dans le cerveau. Je me demande si vous avez fait des expériences pour observer les interactions entre les systèmes de transmetteurs, comme les systèmes sérotonergiques, en réponse à l'administration de tryptophane. En d'autres termes, comment pouvez-vous conclure qu'il s'agit d'une action sur l'acide cynurénique?

R. Bose : Nous y avons songé, et nous aurions poursuivi dans ce sens si nous avions observé une quelconque protection par le tryptophane, et ça n'a pas été le cas.

A. Tasker : Mais vous avez examiné la possibilité?

R. Bose : Non, c'était le probénécide de manière exogène avec l'acide cynurénique. Lorsque l'association probénécide-tryptophane a été administrée avant l'extrait, il n'y avait pas de protection. C'est pourquoi nous n'avons pas poursuivi dans cette voie.

A. Tasker : Donc vous n'avez pas exploré le rôle possible de la sérotonine. Est-ce que c'est ce que vous dites?

R. Bose : Non, nous ne l'avons pas étudié, parce que nous n'avons vu aucun effet protecteur du tryptophane, par exemple dans ce groupe où nous avons administré du tryptophane, du probénécide, du soluté physiologique et de l'extrait. Sans addition d'acide cynurénique exogène, il n'y a pas de protection. Probablement, avec ce type de combinaison, on s'attendrait à ce que les concentrations de sérotonine augmentent, mais cela n'a pas modifié les paramètres à l'étude. C'est pourquoi nous ne sommes pas allés plus loin. Évidemment, il doit y avoir certains autres effets; par exemple, ces animaux étaient presque endormis. Le type de convulsions observé a été modifié et il y avait de l'hypothermie. Tout cela pourrait être dû à l'effet de la sérotonine. Mais en ce qui a trait à la protection, le résultat était nul.

C. Pinsky : J'aimerais faire un commentaire sur la question du Dr Tasker, parce que tous ceux qui ont fait des expériences dans notre groupe sont d'accord pour dire qu'il s'agit d'une question très importante. Chose certaine, elle n'a rien à voir avec la distance qui sépare Winnipeg de Charlottetown, mais elle a quelque chose à voir avec le moment où l'on mesure l'acide cynurénique. Parce que, comme les données du Dr Bose le montrent, il y a une fenêtre temporelle très stricte et que ce fait a une importance clinique; en effet, même si on parvenait à mettre au point des antidotes basés sur des antagonistes pharmacologiques des acides aminés excitateurs, on ne pourrait pas s'attendre qu'une personne qui s'apprête à manger des moules prenne un antidote avant d'aller au restaurant. Le seul moment où cette personne prendra l'antidote, c'est quand elle aura éprouvé les premiers signes de malaise gastrique,

ce qui veut dire toujours après l'exposition; nous avons noté, et c'est très bien ainsi, que l'acide cynurénique est plus efficace, et c'est d'ailleurs presque le seul moment où il l'est, lorsqu'il est administré *après* les préparations d'acide domoïque; si vous l'administrez moins de 30 minutes après l'exposition, il n'a pas tout simplement pas d'effet. Bon, il existe plusieurs explications possibles, dont certaines vous ont été données ce matin, mais tout récemment, on a démontré que l'acide cynurénique agit suivant divers mécanismes autres que la compétition directe au niveau du récepteur de l'acide aminé neuro-excitateur; il est fort possible que le délai de 30 minutes que nous avons observé soit dû non seulement à la barrière hémato-encéphalique et à des considérations d'ordre cinétique, mais à des propriétés du récepteur qui dépendraient de la dose. C'est une possibilité qu'il serait très intéressant d'étudier. Merci.

B. Stavric : Une observation générale : nous vous avons entendu dire que certains phénomènes que vous avez observés avec votre extrait en ce qui concerne l'acide cynurénique sont différents des nôtres. Peut-être est-il important non seulement de mesurer la quantité d'acide domoïque lorsqu'on parle d'extraits entiers, mais également les autres éléments qui sont présents dans l'extrait. Il y a du zinc, par exemple, ou du magnésium dans l'extrait lui-même ou d'autres constituants. Nous ne précisons pas quoi d'autre se trouve dans l'extrait. Une proposition : il serait peut-être nécessaire de réfléchir à ce qu'il pourrait y avoir d'autre dans l'extrait et qui pourrait avoir un effet quelconque.

R. Bose : Je crois que vous venez de faire une observation très importante, parce que nous avons vu qu'un même extrait, même s'il est réfrigéré, ne produit pas le même effet après, disons, une période de 48 heures; c'est pourquoi nous avons dû recourir à la lyophilisation des extraits, que nous avons reconstitués de nouveau lors de chacune des expériences pour garantir la plus grande uniformité possible; il est certain que la composition de l'extrait a pu varier d'un lot de moules à un autre. Cette question est très importante.

A. Tasker : J'aimerais poursuivre dans la même veine : c'est un point très important. Nous avons également observé certaines différences en ce qui a trait à la conservation et à d'autres facteurs du même genre. C'est pourquoi nous avons l'habitude de faire nos expériences en examinant trois formes différentes d'extraits d'acide domoïque provenant de moules toxiques, dans lesquelles l'acide domoïque a été mesuré par CLHR : des extraits équivalents provenant de moules prélevées dans la baie St. Mary avant l'apparition de l'acide domoïque, des extraits dopés ultérieurement avec de l'acide domoïque acheté chez un fournisseur commercial, et, finalement, l'acide domoïque lui-même, la forme pure, tout simplement dissoute dans l'eau ou dans le soluté physiologique selon le besoin. Je pense qu'une partie des divergences observées dans les résultats qui ont été communiqués ici aujourd'hui pourrait en fait s'expliquer par des différences dans les constituants des extraits et je crois qu'il est important de contrôler ces données de la manière qui convient.

Tableau 1.
Profil des effets comportementaux observés chez les souris Swiss-Webster après administration d'extraits de moules contaminées par l'acide domoïque

Comportements fréquemment observés

- État d'apathie mais réactivité maintenue
- Grattage stéréotypé du corps
- Repli sur soi (en tas)
- Recroquevillement des phalanges
- Étirement des membres postérieurs
- Incoordination de la démarche
- Convulsion clonique
- Dyspnée, cyanose
- Mort

Comportements peu fréquemment observés

- Grattage stéréotypé de la tête
- Tours en rond, roulades
- Myoclonie
- Convulsion tonique
- Perte post-ictale du réflexe de redressement
- Morsure, hyperexcitabilité
- Crise prolongée de contractions cloniques de peu d'amplitude (État de mal épileptique)

Tableau 2.
Effets toxiques des extraits d'hépatopancréas de moules contaminées par l'acide domoïque sur des souris Swiss-Webster

Groupe	Dose (mg/kg en I.P.)	N	Grattage taux en %	Convulsions latence* moyenne (taux en %)	Mort en min ± é.t.
I	75	5	80	83 [n=1] (20)	(0)
II	100	5	100	85 ± 3,5 (40)	(0)
III	150	5	100	50 ± 3,3 (80)	(0)
IV	200	7	100	33 ± 1,3 (86)	64 ± 6,9 (100)
V	250	3	100	33 ± 5,6 (100)	45 ± 1,0 (67)
VI	300	5	100	18 ± 0,5 (100)	30 ± 2,1 (100)

*Après injection de l'extrait

Tableau 3.
Effet de l'acide kynurénique, du probénécide et du l-tryptophane sur la toxicité d'extraits d'hépatopancréas de bivalves contaminés par l'acide domoïque chez des souris Swiss-Webster

Groupe	Injections #1	#2	#3	#4	Grattage taux en %	Convulsions latence* moyenne (taux en %)	Mort en min ± é.t.
A	SAL	KYN[1]	HPX[2]	—	(83)	30 ± 2,4 (100)	74 ± 6,7 (100)
B	PROB[3]	KYN	HPX[2]	—	(100)	117 ± 0,5[a,b] (33)	92 ± 20,6 (83)
C	SAL	HPX[4]	KYN	—	(83)	21 ± 0,3[c] (100)	75 ± 8,2[e] (100)
D	PROB[5]	HPX[4]	KYN	—	(100)	16 ± 0,8[c,d] (100)	68 ± 6,0[e] (100)
E	SAL	SAL	KYN	HPX[6]	(100)	32 ± 3,6 (100)	63 ± 13,1 (60)
F	TRYP[7]	PROB[5]	SAL	HPX[6]	(100)	22 ±1,0 (100)	40 ± 3,1 (100)
G	TRYP[7]	PROB[5]	KYN	HPX[6]	(20)	117 ± 7,5[f] (60)	136 ± 28,5[g] (100)

* Latence mesurée à partir du moment où l'extrait est injecté (toutes les injections sont par voie intrapéritonéale)
[1] KYN = acide kynurénique, 600 mg/kg administré 15 min avant ou après HPX
[2] Extrait d'hépantopancréas (HPX), 200 mg/kg
[3] Probénicide 200 mg/kg, 60 min avant l'injection #3
[4] HPX = 300 mg/kg
[5] Probénécide 100 mg/kg, 60 min avant l'injection de HPX
[6] 250 mg/kg
[7] L-Tryptophane 100 mg/kg 3 h avant l'injection de HPX
[a] P≤0,01 comparativement au groupe IV (tableau 2)
[b] P≤0,01 comparativement au groupe A
[c] P≤0,05 comparativement au groupe VI (tableau 2)
[d] P≤0,01 comparativement au groupe C
[e] P≤0,01 comparativement au groupe VI (tableau 2)
[f] P≤0,01 comparativement aux groupes V (tableau 2), E et F
[g] P≤0,05 comparativement aux groupes V (tableau 2), E et F, G (P≤0.01)
n = 5 à 7 souris par groupe

Tableau 4.
Effet de la phénytoïne, de l'éthosuximide et du dextrométorphane chez des souris Swiss-Webster auxquelles on a administré des extraits de moules toxiques

Injection 1	Intervalle (min)	Injection 2	Convulsion		Mort	
			Taux en %	Latence	Taux en %	Latence
Souris adultes						
SAL (témoin)	20	WMX	100	25±2,0	100	34±3,9
PHEN	20	WMX	100	39±2,7[a]	100	57±6,1[a]
ETSX	20	WMX	100	34±1,7[b]	78	52±4,2[a]
SAL (témoin)	60	WMX	89	21±1,6	89	24±1,9
PHEN	60	WMX	89	36±4,3[a]	78	50±6,7[a]
ETSX	60	WMX	67	21±2,3	89	38±7,0
Jeunes souris						
SAL (témoin)	60	MHX	100	28±0,6	100	79±29,6
DEXM	60	MHX	44	43±11,9	22[c]	54±2,0

n = 4 à 9 souris par traitement, tous les agents étant administrés par voie intrapéritonéale
SAL = soluté physiologique, 10 mL/kg
WMX = extrait complet de moules, 40 mL/kg
PHEN = phénytoïne, 15 mg/kg
ETSX = éthosuximide, 200 mg/kg, i.p.
DEXM = dextrométhorphane, 20 mg/kg
[a] $P<0,01$
[b] $P<0,001$ [c] $P<0,05$ comparativement à la valeur correspondante du groupe témoin par la méthode ANOVA/Duncan
comparativement à la valeur correspondante du groupe témoin, par χ^2

19. Perte de mémoire consécutive à l'intoxication par l'acide domoïque après ingestion de moules toxiques

R.J. Zatorre

Les perturbations de la mémoire peuvent résulter de lésions de diverses formations neurales. La documentation existante sur l'amnésie chez les humains et les non-humains indique que la destruction bilatérale du système limbique entraîne la forme la plus grave et la plus permanente de perte de mémoire, à savoir l'amnésie, qui se caractérise habituellement par une incapacité de former de nouvelles traces mnésiques. Parfois, cette perturbation s'accompagne d'un certain degré d'amnésie rétrograde, c'est-à-dire d'une difficulté à récupérer l'information acquise avant la survenue de l'amnésie. Dans les syndromes amnésiques les plus «purs», les autres fonctions cognitives du sujet, comme le langage, le raisonnement, etc., sont habituellement entièrement intactes[1]. Le cas de H. M., un sujet qui a subi une excision bilatérale de la région amygdalienne et hippocampique afin de le soulager de ses convulsions, est l'un des cas les plus évidents et les plus étudiés. À la suite de l'intervention, cette personne n'a rien perdu du point de vue intellectuel, mais elle était essentiellement incapable d'encoder des informations nouvelles, y compris des événements marquants concernant sa propre vie. De manière caractéristique, H. M et d'autres sujets amnésiques ont conservé une capacité normale de rétention à court terme qui leur permet de retenir l'information nouvelle aussi longtemps qu'elle est gardée dans le domaine du conscient (par exemple, par répétition manifeste); cependant, dès que le sujet se concentre sur une autre tâche, l'information nouvelle n'est plus accessible.

Les personnes intoxiquées par l'acide domoïque après avoir consommé des moules de l'Île-du-Prince-Édouard en 1987 présentent divers degrés de perte de mémoire, et dans certains cas, sont atteintes d'amnésie véritable; à notre avis, la cause la plus probable de ces perturbations est l'atteinte du système hippocampique résultant de l'action excitotoxique de l'acide domoïque (Teitlebaum, Zatorre, Carpenter, Gjedde, Evans, Gendron et Cashman, article en voie de publication). Dans le présent article, on trouvera une description du profil neuro-psychologique des malades ainsi qu'un bref rappel des faits qui appuient l'hypothèse de la destruction hippocampique.

En tout, 14 malades ont été soumis à une batterie complète de tests neuro-psychologiques. Les tests ont été administrés au cours d'une période variant de 4 mois à 1 an après le début de la phase aiguë de la maladie. Dans la plupart des cas, ils ont été étalés sur une période de plusieurs jours. Parmi ces sujets, 12 ont montré un certain degré de perte de mémoire, un sujet présentait un profil neuro-psychologique entièrement normal et un autre, le plus âgé du groupe (87 ans), n'a pu être testé en raison de son incapacité intellectuelle globale. Ainsi, les données présentées

Tableau 1.
Résultats chez 12 sujets : Mesure du QI au moyen de la WAIS-R et résultats des tests de dénomination et de compréhension (moyenne et dispersion)

	Âge	QI (WAIS-R)			Dénomination (max. 26)	Compréhension (max. 36)
		Verb.	non-verb.	Total		
Moyenne	64,8	109	96	104	20,7	32,8
Dispersion	44-84			(81-130)	(17-24)	(30-36)

Tableau 2
Résultats des tests neuro-psychologiques : Mémoire

	Rappel verbal		Figure complexe de Rey	
	Immédiat	Différé	Copie	Rappel différé
Moyenne	12,8	7,0	25,3	4,13
Dispersion	(6-20)	(2-17)	(17-30)	(0-10)
Normale	12-15	12 et +	25-36	12 et +

Note : Le rappel verbal immédiat représente la somme des mots appris pendant le troisième essai du sous test des mots-couplés et la moyenne du nombre d'unités remémorées dans le sous-test de mémoire logique (passages verbaux) de l'échelle de mémoire Wechsler. La plage normale est estimée à partir des données normalisées pour l'âge (Hulicka, 1966). Le rappel verbal différé représente la somme des mots remémorés dans le sous-test des mots couplés après un certain retard plus la moyenne du rappel différé des deux passages verbaux. La fonction visuo-spatiale est évaluée par le nombre d'unités de la figure complexe de Rey qui sont copiées correctement; la mémoire visuo-spatiale est évaluée selon le nombre d'unités remémorées après un certain retard.

ci-après ne portent que sur douze sujets. Il faut noter qu'avant l'intoxication, aucun des sujets n'était atteint de perturbations mnésiques, ce qui a été confirmé par leurs proches. La plupart des sujets avaient une vie professionnelle ou sociale très active avant d'ingérer les moules.

La batterie de tests comprend l'échelle d'intelligence de Wechsler pour adultes révisée[2], qui fournit une mesure de la capacité intellectuelle globale. Afin d'évaluer la fonction mnésique, on a modifié l'échelle de mémoire de Wechsler en y ajoutant un rappel différé de 90 minutes; la mémoire visuo-spatiale a été évaluée par rappel différé de la figure complexe de Rey Osterreith[3]. L'évaluation du langage a été réalisée à l'aide d'un test de dénomination des objets[4] et celle de la compréhension verbale, par le test des jetons[5]. Le Wisconsin Card Sorting Test, qui décèle les perturbations de la pensée conceptuelle fréquemment liées aux lésions du lobe frontal[6], a également été administré.

Le tableau 1 contient les données relatives à plusieurs tests ne faisant pas appel à la mémoire. La moyenne de 104 du QI à l'échelle complète reflète les facultés intellectuelles, habituellement normales et bien conservées, de la plupart des sujets. La dispersion des résultats (81 à 130) est en corrélation avec la capacité estimée de chaque sujet avant l'intoxication; ainsi, le résultat le plus faible est celui d'un col bleu et le résultat le plus élevé celui d'un professeur d'université. Bon nombre de sujets ont obtenu un résultat plus élevé à la partie verbale qu'à celle qui évalue la capacité visuo-spatiale et constructive. On ignore encore si cette observation n'est pas simplement caractéristique de l'échantillon, qui comprend de nombreux sujets ayant reçu une éducation supérieure, ou s'il s'agit d'un effet non spécifique, comme un ralentissement généralisé qui toucherait préférentiellement les sous-tests non verbaux. De toute manière, les QI verbal et non verbal se situent dans la plage moyenne.

Les tests de langage n'ont montré aucune anomalie, comme le montrent les résultats des tests de compréhension et de dénomination d'objets (tableau 1). Ces résultats concordent avec les bons résultats obtenus aux tests verbaux de QI dont il a été question plus haut. Parmi les 11 sujets à qui on a administré le Wisconsin, 8 ont réussi et 3 ont échoué, bien que deux de ces derniers sujets aient réussi de façon partielle. Ces résultats laissent croire que la capacité de pensée conceptuelle est généralement suffisante dans le présent échantillon.

Les principales anomalies ont été observées au cours de l'évaluation formelle des fonctions mnésiques. Le tableau 2 contient les résultats de deux tests de mémoire verbaux. Dans le premier test, on fait la lecture d'un passage en prose que le sujet doit répéter immédiatement et ensuite, on fait la lecture d'un second passage; on enregistre la justesse et le nombre des idées dont le sujet se souvient. Le deuxième test porte sur la mémorisation d'une liste de 10 mots-couplés comprenant des associations simples (p. ex., est-ouest) ainsi que des associations plus complexes (p. ex., écrasement- noirceur). Après une période d'au moins 90 minutes, mais sans que le sujet ne soit prévenu, on procède à un second rappel. Celui-ci est généralement beaucoup plus sensible que le rappel immédiat pour évaluer les pertes de mémoire, puisque dans le cas du rappel immédiat, une bonne partie de l'information peut être répétée grâce à la mémoire à court terme.

Le rappel verbal immédiat n'est pas toujours perturbé (tableau 2), bien que certains sujets aient éprouvé même ici des difficultés considérables. Un déficit beaucoup plus prononcé est mis en évidence par le rappel différé, qui montre un résultat moyen nettement plus faible que la normale et, chez certains sujets, un souvenir pratiquement nul. Au fait, cinq des sujets sont tout à fait incapables de se remémorer les passages en prose, même avec l'aide de l'examinateur. Le souvenir des mots couplés est aussi très faible, certains sujets ne répondant correctement que dans les cas d'associations très fortes pour lesquelles on peut aisément deviner la réponse.

Les résultats du test de la figure complexe de Rey indiquent également une grave perturbation de la mémoire. Si la copie du dessin est satisfaisante dans la plupart des cas, ce qui confirme l'absence de tout déficit visuo-spatial ou constructif grave, lorsque le dessin a été évoqué de nouveau, 45 minutes après avoir été copié, aucun des sujets n'a bien réussi et plusieurs étaient incapables d'en reproduire un seul détail.

L'interrogatoire non structuré des malades et de leurs proches a également montré, dans certains cas du moins, un certain degré d'amnésie rétrograde remontant à des mois ou des années avant la survenue de la maladie. À titre d'exemple, certains sujets ne se souviennent que vaguement des circonstances dans lesquelles ils ont consommé des moules; d'autres sont incapables de se souvenir clairement des événements marquants survenus avant l'intoxication (p. ex., un des sujets ne pouvait pas se souvenir des préparatifs entourant le mariage prochain de sa fille).

Il importe de noter que la rétention à court terme semble intacte chez ces malades: ils sont capables de répéter une série de chiffres de façon normale immédiatement après leur présentation. Ils peuvent aussi reconstituer une séquence visuo-spatiale de blocs de Corsi. Il semble donc que le déficit mnésique touche la rétention ou la récupération d'informations nouvelles une fois qu'elles sont sorties du domaine de la conscience.

Le seul fait que plusieurs des malades sont des personnes âgées n'explique pas la persistance des troubles mnésiques. Premièrement, comme il a été signalé plus haut, aucun des sujets ne semble être atteint de déficits prélésionnels. Deuxièmement, même si la perte de mémoire est mise en regard de normes corrigées selon l'âge[7], le déficit persiste. En outre, il n'existe pas de corrélation apparente entre le degré de perte de mémoire et l'âge dans l'échantillon étudié; en effet, le plus jeune des malades, un professeur de physique de 44 ans titulaire d'un doctorat, fait partie des sujets chez qui le souvenir des passages verbaux et de la figure géométrique est le plus gravement perturbé.

Quant à la corrélation anatomo-clinique, il n'est possible de situer précisément le siège de la lésion chez aucun des sujets soumis aux tests neuro-psychologiques. À l'opposé, si, chez les sujets décédés au cours de la phase aiguë, nous n'avons pas d'évaluation de la perte de mémoire, les trouvailles neuro-pathologiques sont cependant très évocatrices, puisque dans tous les cas, les autopsies ont montré des lésions graves dans la région de

l'hippocampe (Teitlebaum et coll., article en voie de publication). Les caractéristiques neuro-psychologiques de la perte de mémoire des survivants sont très semblables à celles que l'on observe chez les personnes ayant subi des lésions hippocampiques bilatérales. En outre, des expériences réalisées chez des animaux et portant sur l'acide kaïnique, un analogue de l'acide domoïque, ont montré que le système hippocampique est gravement atteint[8]. Il est donc parfaitement raisonnable de conclure que l'acide domoïque contenu dans les moules toxiques a causé des lésions de degrés divers dans l'hippocampe et dans ses structures connexes, lésions qui ont entraîné les perturbations mnésiques mises en évidence par les tests neuro-psychologiques.

Pour l'instant, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer la dispersion des perturbations mnésiques observées; en effet, certains sujets montrent un amnésie évidente du point de vue clinique alors que d'autres ne sont que légèrement atteints et ont pu reprendre leurs activités normales. De plus, on ne s'explique pas pourquoi un des sujets ne semble présenter aucune séquelle neuro-psychologique après avoir consommé des moules toxiques. Il se peut que certains sujets aient consommé une quantité beaucoup plus élevée de toxine que d'autres, d'ou divers degrés de déficits. Il est également possible que certains sujets aient éliminé ou métabolisé la toxine plus rapidement ou plus efficacement que d'autres ou encore, que le passage à travers la barrière hémato-encéphalique se soit effectué à des degrés variables. Pour le moment, ces explications demeurent hypothétiques, bien qu'il faille noter que bon nombre des malades les plus amnésiques étaient atteints de maladies chroniques, diabète ou insuffisance rénale, ce qui laisse croire que ces maladies peuvent avoir joué un rôle dans l'interaction entre l'acide domoïque et le système nerveux central.

Remerciements

Nous remercions Mesdames Susan Pigott, Ginette Marcil et Annie Sapin-Leduc pour la réalisation des tests neuro-psychologiques et le Dr Raymonde Labrecque pour avoir fourni les données concernant un des malades.

Références

1. Whitty CWM, Zangwill O. *Amnesia*. London: Butterworth, 1966.
2. Wechsler D. Psychological Corporation. Wechsler Adult Intelligence Scale. Revisé. 1981. Harcourt Brace Jovanovich, New York.
3. Rey A. *Examen psychologique dans les cas d'encephatopathie traumatique*. Archives de Psychologie 1942; 28: 112.
4. Oldfield RC, Wingfield A. *Response latencies in naming objects*. Q J Exp Psychol 1965; 17: 273-281.
5. DeRenzi E, Vignolo L. *The token test: a sensitive test to detect receptive disturbances in aphasia*. Brain 1962; 85: 665-675.
6. Milner B. *Effects of different brain lesions on card sorting*. Archives of Neurology 1963; 9: 90-100.
7. Hulicka IM. *Age differences in Wechsler Memory Scale scores*. J Genet Psychol 1966; 109: 135-145.
8. Coyle J. *Neurotoxic action of kaininc acid*. J Neurochem 1983; 41: 1-11.

Discussion

M. Ball : J'aurais une question se rapportant au suivi anatomo-pathologique de deux clients à vie du Dr Penfield, dont un qui a été opéré deux fois pour une épilepsie temporale réfractaire. Gordon Matheson, qui était chargé de la neuropathologie à l'Institut neurologique de Montréal dans ces années-là a publié un article important dans *Archives of Neurology*; c'était en 1974 ou en 1964, ma mémoire fait défaut. Quoi qu'il en soit, dans cet article, il montrait qu'il y avait chez le patient qui avait été opéré deux fois une corrélation clinique possible avec l'emplacement ou la partie de l'hippocampe qui a été réséquée chirurgicalement. Penfield avait formulé des hypothèses au sujet de certaines voies de facilitation posées dans un courant de conscience, depuis la naissance. Après la première intervention chirurgicale, le malade a éprouvé une amnésie rétrograde de quatre mois et, quelque chose comme un an plus tard, lorsqu'il a été opéré pour la deuxième fois afin d'enlever un autre petit bout d'hippocampe vers l'arrière, on a observé une amnésie rétrograde de deux ans. Nous avons entendu dire ce matin que chez les rats ayant reçu de l'acide kaïnique par voie intra-péritonéale, il semblait que les manifestations histopathologiques siégeaient dans la partie CA3 de l'hippocampe, plutôt que dans la partie caudale. J'aimerais vous demander si vous ou vos collègues, Dr Carpenter ou d'autres, ont décelé une différence dans le sens antéro-postérieur dans les lésions de l'hippocampe chez les sujets qui sont déjà décédés.

R. Zatorre : Oui, la question devrait être adressée au Dr Carpenter. Je crois que le cas que vous venez de décrire est le cas de PB qui, effectivement, est très révélateur et, si ma mémoire est fidèle, ce qui est arrivé dans ce cas c'est que, vous avez tout à fait raison, la résection initiale n'avait produit qu'un problème temporaire dont le malade s'est remis, mais n'a pas entraîné la guérison des crises. Aussi, Penfield avait procédé à une résection plus étendue qui a effectivement guéri les crises, mais qui a laissé le malade avec un syndrome amnésique très grave; à l'époque, on ne savait pas clairement pourquoi une excision unilatérale pouvait entraîner un syndrome amnésique aussi grave. Au fait, lorsque l'autopsie a été réalisée, et je crois que c'était là le sujet de l'article de Matheson, la constatation intéressante a été qu'il y avait une nécrose très étendue dans la région de l'hippocampe du côté opposé. Ainsi, il s'agissait probablement d'une personne qui fonctionnait avec un seul hippocampe et, lorsque vous en faites l'ablation, il ne vous reste plus grand chose pour continuer. Mais en ce qui concerne l'amnésie rétrograde, il s'agit d'un élément intéressant. Nous n'avons pas de mesures vraiment fiables de la mémoire rétrograde, c'est pourquoi je n'en ai pas fait mention. À partir des descriptions des sujets, il semblerait qu'il y ait un certain degré d'amnésie rétrograde. Certains de ces malades sont très vagues lorsqu'il s'agit de fournir des renseignements sur leurs antécédents. Par exemple, un de ces derniers, qui a immigré au Canada dans les années 50, ne se souvenait pas vraiment des circonstances entourant son arrivée au pays. Nos mesures sont si imprécises que je ne pense pas qu'on puisse mettre

cette amnésie rétrograde en rapport avec la gravité d'une éventuelle amnésie antérograde. Pour ce qui est de la question ayant trait à l'hippocampe antérieur et postérieur, j'ignore si le Dr Carpenter a des observations à faire.

S. Carpenter : Il ne semblait y avoir aucune différence entre les parties antérieure et postérieure de l'hippocampe dans le cas des cerveaux que j'ai examinés.

B. Pappas, Université Carleton : Avez-vous constaté que ces personnes étaient très sensibles au benzodiazépam? C'est un médicament qui produit des troubles de la mémoire et un syndrome apparenté à la démence chez des personnes normales. Trouvez-vous que ces malades présentent une sensibilité particulière à la benzodiazépine?

R. Zatorre : La prescription de médicaments n'est pas mon métier. Peut-être le Dr Teitelbaum pourrait-elle répondre?

J. Teitelbaum : Des 14 malades qui font l'objet d'un suivi à l'heure actuelle, aucun ne prend de benzodiazépam, sauf un. Et ce malade n'est pas inclus dans l'étude. Il est affecté de manière très globale. Il a été traité à l'Haldol presque depuis l'apparition de la maladie et nous n'avons pu établir clairement si les moules qu'il a consommées provenaient de l'Île-du-Prince-Édouard. Les autres ne reçoivent pas de benzodiaépam et n'en ont pas reçu, c'est pourquoi je ne peux répondre à votre question.

B. Pappas : L'autre question que j'aimerais poser a trait à l'observation selon laquelle les malades amnésiques, comme H.M., pouvaient apprendre des tâches comme l'écriture en miroir à une vitesse relativement normale; pourtant ils n'ont aucun souvenir d'avoir eu cette expérience avant et c'est ce qui a amené à faire la distinction entre la mémoire dite procédurale et la mémoire dite épisodique. Je me demande simplement si vous avez fait des choses semblables avec vos malades?

R. Zatorre : Il s'agit d'un point très intéressant, je pense. C'est une des raisons pour lesquelles nous voulons poursuivre l'étude de ces malades. Maintenant que nous croyons avoir déterminé ce qu'ils ont, cela nous permet de vérifier un certain nombre d'hypothèses au sujet de la mémoire; l'une de ces hypothèses est précisément celle que vous signalez. Nous voulons déterminer si la mémoire «implicite» ou «procédurale», peu importe comment vous l'appelez, est épargnée et nous faisons des tests de ce type chez nos sujets. Nous n'avons pas encore vraiment de données, mais nous avons certainement l'intention de pousser cette idée plus loin.

20. *Intoxication par l'acide domoïque chez les humains : Destruction excitotoxique des voies glutamatergiques du cerveau mise en évidence par la mesure du métabolisme du glucose au moyen de la tomographie à positons (TP)*

A. Gjedde et A.C. Evans

Résumé

Nous avons utilisé la tomographie à positons (TP) pour mesurer le métabolisme de l'hippocampe et de la cinquième circonvolution temporale du cerveau de sujets intoxiqués par l'acide domoïque contenu dans les moules de l'Île-du-Prince-Édouard. Cet analogue de l'acide kaïnique excite de façon spécifique certains neurones de l'hippocampe. Nous avons trouvé une réduction importante du métabolisme du glucose dans cette partie du cerveau, ce qui concorde avec la perte de mémoire à court, moyen et long terme chez les sujets atteints.

Introduction

En novembre 1987, 145 Canadiens sont tombés malades après avoir ingéré des moules de l'Île-du-Prince-Édouard qui contenaient de 100 à 300 mg d'acide domoïque par portion (il est possible que le nombre de sujets malades représente moins de 1 % du nombre de personnes qui ont ingéré cette quantité d'acide domoïque).

Parmi les cas enregistrés, environ le tiers ont présenté des symptômes neurologiques. Quatorze d'entre eux ont été choisis pour une étude plus approfondie, parmi lesquels cinq ont fait l'objet d'une étude du métabolisme régional du glucose dans le cerveau au moyen de la TP; quatre autres sont décédés.

L'acide domoïque (AD), un analogue puissant des acides kaïnique et glutamique (acides aminés excitateurs), est synthétisé par plusieurs plantes aquatiques, y compris l'algue marine *Chondria armata*. Son affinité pour les récepteurs de glutamate du type kaïnate dans le système nerveux central est trois fois plus grande que celle de l'acide kaïnique. On trouve ces récepteurs à affinité élevée dans le prosencéphale et sur les terminaisons des fibres moussues de la région CA3 de l'hippocampe. L'acide kaïnique a déjà servi à réaliser un modèle animal de l'épilepsie temporale.

Dans les 14 cas d'ingestion d'acide domoïque que nous étudions, tous les sujets ont présenté de la confusion et des troubles de la conscience dès une à 48 h après l'ingestion. Les effets maximaux se sont produits en l'espace de 4 à 72 h; une amélioration s'est poursuivie durant une période de 24 h à 12 semaines après l'ingestion.

Cinq des 14 sujets étudiés chez nous ont présenté des crises toniques et cloniques généralisées et des crises complexes partielles. Quatre de ces cinq sujets ont présenté des mouvements masticatoires et une myoclonie de la face, et tous sont devenus comateux. Ces symptômes ressemblent étroitement à ceux que l'on a observés chez des animaux intoxiqués par l'acide kaïnique, chez qui certaines cellules de l'hippocampe ont été détruites.

Nous formulons l'hypothèse suivante : les effets de l'intoxication par l'acide domoïque doivent ressembler aux effets de l'administration expérimentale d'acide kaïnique aux animaux, et les conséquences de l'intoxication chez les humains doivent ressembler aux effets de l'ablation du noyau amygdalien et de l'hippocampe chez des sujets ayant subi une intervention chirurgicale visant à traiter l'épilepsie temporale.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons déterminé, chez quatre des 14 sujets, le taux du métabolisme glucosé dans certaines régions particulières du cerveau, y compris le cortex cérébral, le noyau amygdalien et l'hippocampe, deux à trois mois après l'apparition des premiers symptômes.

Méthodes

Chez les 4 sujets, on pratique la TP et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Selon les méthodes décrites par Evans et coll.[1], on obtient dans les deux modalités des plans de coupe correspondants qui permettent de reconnaître de façon précise les régions intéressées. La séance de TP est réalisée entre deux et quatre mois après l'intoxication. On fait aussi subir les mêmes examens à quatre personnes âgées bien portantes dans des positions et des orientations équivalentes, afin d'obtenir des valeurs témoins utiles, en particulier pour les petites formations limbiques où les variations par volumes partiels se feraient le plus sentir.

On réalise l'IRM au Gyroscan Philips de 1,5-T en coupes de 12 mm, ce qui s'accorde avec la résolution axiale des images obtenues par TP. Les mesures de TP se font avec le Therascan 3128, un tomographe à trois plans ayant une résolution spatiale de 12 mm (transversale) sur 11 mm (axiale)[2]. On reconstruit les images en apportant des corrections pour les événements aléatoires, la variation du rendement du détecteur, l'atténuation et la dispersion. Dans chaque TP, on a balaye trois plans horizontaux parallèles au plan temporal, à 12 mm d'intervalle, en suivant un minutage dynamique d'obtention des images. Quarante-cinq minutes après l'injection, on effectue quatre balayages interfoliés à trois plans, pour obtenir un ensemble de données à 12 plans échantillonnées de façon précise dans la zone temporale. La figure 1 montre le plan de balayage dans lequel les régions du noyau amygdalien et de la cinquième circonvolution temporale se voient le mieux chez les quatre sujets.

La consommation régionale de glucose (TMGlc) est déterminée par injection intraveineuse de 18 fluorodésoxyglucose (FDG). Pour plus de précision, cette analyse se fait de façon «dynamique», c'est-à-dire que la radioactivité régionale est enregistrée plusieurs fois durant l'examen. On obtient ainsi 18 enregistrements de la radioactivité des tissus en 20 minutes (10 balayages de 1 minute, quatre balayages de 2 minutes et un balayage de 5 minutes) après l'injection. On prélève

Figure 1
Neuroanatomie normale du plan de balayage, montrant l'endroit où se trouvent le noyau amygdalien et la cinquième circonvolution temporale

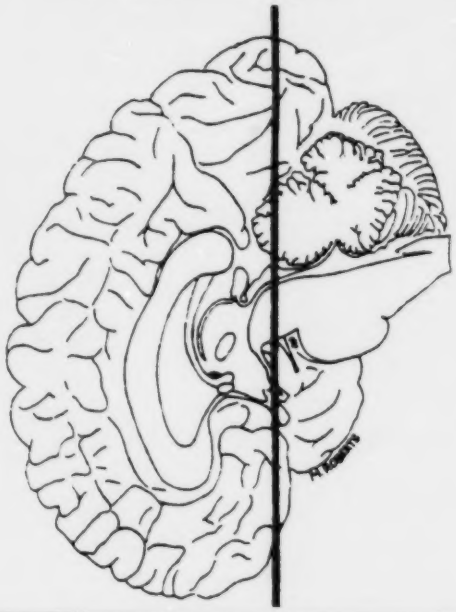
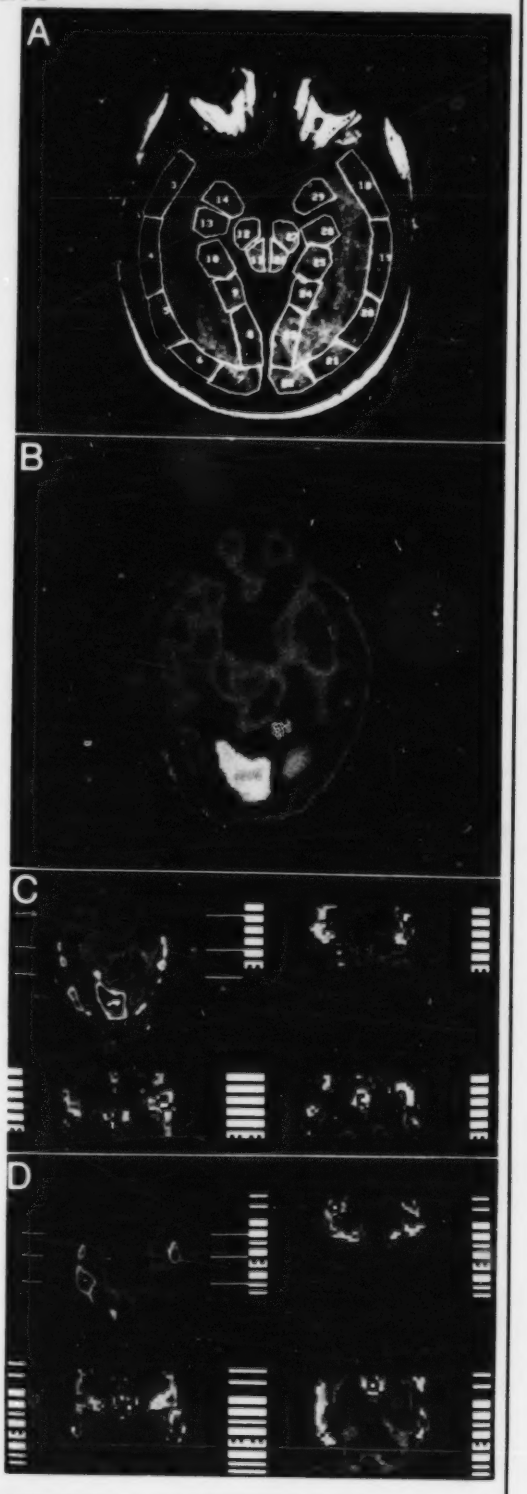


Tableau 1.
Taux métabolique moyen du glucose chez quatre sujets présentant les effets d'une intoxication par l'acide domoïque et chez quatre témoins appartenant à la même tranche d'âge et au même sexe

Âge/sexe	Test de mémoire	QI (échelle complète)	TMGlc	
			Cortex cérébral	Noyau amygdalien et cinquième circonvolution temporale
Années	(% de la normale)	(% de la normale)	(μmol hg^{-1} min^{-1})	
*69+5			22±3	19±2
46/F	129	116	40±2	26±1
59/M	92	117	33±1	26±1
84/M	55	86	26±1	15±1
84/M	17	92	11±0.4	3±3

* Sujets témoins âgés (1F, 3M)

Figure 2



Partie A. Image obtenue, chez un sujet ayant subi une intoxication par l'acide domoïque, par résonance magnétique pondérée en T_1 dans le plan illustré à la figure 1, recouverte d'une matrice régionale adaptée à partir d'images d'un atlas.

Partie B. Tomogramme du métabolisme glucosé chez le même sujet, dans le même plan.

Partie C. Reconstruction quasi tridimensionnelle d'un tomogramme du métabolisme glucosé montrant un faible taux dans la cinquième circonvolution temporale dans le plan coronal (lettre A).

Partie D. Reconstruction tridimensionnelle d'un tomogramme du métabolisme glucosé d'un sujet témoin sain, montrant la cinquième circonvolution temporale dans le plan coronal (lettre A).

du sang artériel pour la détermination de la radioactivité du plasma.

Les tomogrammes ainsi obtenus sont analysés à l'aide de matrices anatomiques adaptables de régions connues du cerveau qu'on superpose aux images sériées, obtenues de façon dynamique. On assure ainsi la reproductibilité de l'analyse régionale des données concernant tous les sujets[1].

La méthode utilisée pour calculer le taux métabolique *in vivo* du glucose dans les tissus du cerveau est une modification de celle de Sokoloff et coll.[3], formulée par Kuwabara et coll. (données non publiées). Selon Sokoloff, le taux métabolique du glucose correspond à la clairance nette du FDG dans le cerveau 45 minutes après l'injection, multipliée par la concentration du glucose dans le plasma artériel et divisée par une constante dite «lumped» pour l'isotope. La valeur de cette constante habituellement utilisée est celle qui a été estimée par Huang et coll.[4], soit 0,42. Dans la modification de Kuwabara et coll. (données non publiées), on utilise la régression non linéaire par les moindres carrés avec contrainte de la courbe temps-activité du tissu cérébral pour obtenir des estimations individuelles directes de la «constante» et le taux du métabolique glucosé à partir des 18 mesures de radioactivité des 20 premières minutes de TP[5].

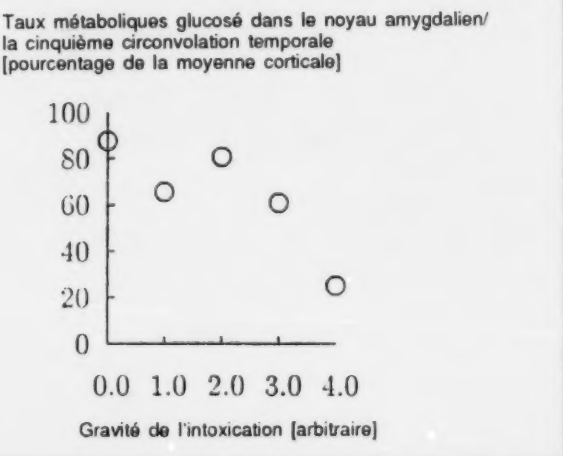
Résultats

Le tableau 1 indique les résultats obtenus pour quatre sujets présentant divers degrés d'intoxication par les moules. Le taux du métabolisme glucosé (TMGlc) dans le cortex cérébral a également été déterminé chez quatre personnes âgées bien portantes. Le tableau 1 met les moyennes du TMG pour le cortex d'une part, et pour le noyau amygdalien et la cinquième circonvolution temporale d'autre part, en rapport avec les résultats obtenus par les sujets dans les tests de QI et de mémoire.

La figure 2 illustre la corrélation TP-IRM sur laquelle l'analyse de l'image a été fondée. La partie A montre l'image obtenue par résonance magnétique pondérée en T1 au niveau du plan présenté à la figure 1. La partie B montre l'image fonctionnelle du métabolisme de glucose dans le même plan. La partie C montre les reconstructions coronales de la TP réalisée chez un sujet (un homme de 59 ans). À titre de comparaison, la partie D montre les mêmes reconstructions de la TP réalisée chez un volontaire sain. Lorsque l'on compare la coupe coronale A de la partie C à la coupe coronale A de la partie D, on remarque l'absence de formation hippocampique dans la première.

La figure 3 montre la relation qui existe entre le taux métabolique relatif du glucose dans la région du noyau amygdalien et de la cinquième circonvolution temporale chez ces 4 sujets d'une part, et l'estimation de la gravité de leur intoxication par l'acide domoïque d'autre part. L'unité représentant l'intensité des déficits est arbitraire.

Figure 3
Taux métabolique glucosé (en pourcentage de la moyenne corticale) dans le noyau amygdalien et la cinquième circonvolution temporale (ordonnée), en fonction de la perturbation du sujet en degrés arbitraires (abscisse)



Discussion

Avant l'intoxication, les personnes dont il est question dans le tableau étaient parfaitement normales du point de vue fonctionnel. Seule la femme de 46 ans s'est rétablie complètement. Tous les autres sujets ont subi une perte de mémoire permanente qui les a empêchés de reprendre le travail. On a, de façon générale, observé une diminution du taux métabolique du glucose dans le cortex cérébral en fonction de l'âge. Cependant, en plus de la diminution générale qui peut ou non avoir été accentuée par l'agression toxique, les régions du noyau amygdalien et de la cinquième circonvolution temporale ont subi une diminution plus poussée du taux métabolique, par rapport à la moyenne corticale. Cette diminution est illustrée à la figure 3.

Nous avons montré que les sujets ont subi une agression toxique qui a entravé l'activité fonctionnelle des formations limbiques du cerveau antérieur, ce qui confirme leur sensibilité particulière aux effets pathogènes des acides aminés excitateurs. La relation qui existe entre les troubles spécifiques de la mémoire qu'ont présentés les sujets les plus atteints et la diminution focale du métabolisme énergétique dans la région du noyau amygdalien et de la cinquième circonvolution temporale confirme la participation de ces formations dans la fonction de mémoire.

Références

1. Evans AC, Beil C, Marrett S, Thompson CJ, Hakim A. *Anatomical-functional correlation using an adjustable MRI-based region-of-interest atlas with positron emission tomography*. J Cereb Blood Flow Metab 1988; 8: 513-530.
2. Cooke BE, Evans AC, Fanthome EO, Alarie R, Sendyk AM. *Performance figures and images from the Therascan 3128 positron emission tomograph*. IEEE Trans Nuc Med Sc NS 1984; 31: 640-644.

3. Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, et coll. *Deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anaesthetized albino rat*. J Neurochem 1977; 28: 897-916.
4. Huang SC, Phelps ME, Hoffmann EJ, Sideris K, Selin CJ, Kuhl DE. *Non-invasive determination of local cerebral metabolic rate of glucose in man*. Am J Physiol 1980; 238: E69-E82.
5. Gjedde A, Kuwabara H. *Direct estimation of regional lumped constant by dynamic positron tomography with labelled fluorodeoxyglucose in humans*. Soc Neurosci Abstr 1989; 14: 48.

Discussion

Question provenant de la salle : Albert, comment croyez-vous que l'acide domoïque parvient dans le cerveau? Est-ce qu'il utilise les transporteurs des dicarboxylates pré-existants?

A. Gjedde : Prenons le glutamate; il s'agit d'une substance qui, du point de vue téléologique et pour d'autres raisons, ne devrait pas traverser facilement la barrière, et cela semble être le cas. Ces acides aminés acides sont très mal nantis du point de vue transport bien que, et j'ai le regret de le dire, l'acide domoïque et l'acide kaïnique n'aient pas fait l'objet de mesures jusqu'ici. À mon avis, ce serait là une des premières questions à mettre à l'ordre du jour pour les recherches futures : mesurer la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique à ces deux composés. Mais on ne peut jamais parler d'imperméabilité absolue dans le cas de la barrière hémato- encéphalique. Si les doses sont suffisamment élevées ou si l'exposition est suffisamment longue, même les protéines finiront par pénétrer dans le tissu cérébral et je suis certain qu'il s'agit là simplement d'un effet de masse causé si la dose est forte. Je ne m'étonne pas que l'effet soit plus grand chez les rats que chez les singes et les humains, à cause des trous qui existent chez eux dans la barrière hémato-encéphalique. Par exemple, les organes circumventriculaires sont comparativement beaucoup plus volumineux chez les animaux de petite taille que chez les mammifères de plus grande taille, ce qui signifie que cet effet, qu'on pourrait appeler effet de débordement, est beaucoup plus important chez les rongeurs que chez le singe et l'homme. De fait, dans un certain nombre de discussions sur les peptides trouvés dans le cerveau du rat, on indique que ces derniers sont déversés depuis la circulation sanguine par l'intermédiaire des organes circumventriculaires; je suis convaincu que c'est là la seule façon par laquelle ces composés peuvent pénétrer dans le cerveau.

21. *Effets gastro-intestinaux de moules contaminées et antidotes possibles*

G.B. Glavin, C. Pinsky et R. Bose

Résumé

La récente vague d'intoxication amnésiante par les mollusques survenue au Canada atlantique s'est caractérisée par un état pathologique grave de l'appareil digestif et du système nerveux central. Nous avons examiné les effets gastro-intestinaux d'extraits acides de moules bleues (*Mytilus edulis*) contaminées par l'acide domoïque, la toxine soupçonnée d'être à l'origine de cette intoxication. Nous avons également recherché les effets gastriques de l'acide domoïque pur ainsi qu'un antagoniste possible potentiel des récepteurs d'aminoacides neuroexcitateurs, l'acide kynurénique.

Les extraits de moules provoquent des ulcères gastriques (antraux), des ulcères duodénaux, une hypérémie gastrique et duodénale accompagnée de saignements, de l'ascite. L'acide kynurénique protège de façon significative contre cette gastropathie, particulièrement lorsqu'il est administré de 60 à 75 minutes après l'extrait.

L'acide domoïque pur cause la mort de toutes les jeunes souris, qui montrent des saignements gastriques, particulièrement aux doses les plus fortes.

Chez les rats ne recevant aucun autre traitement, l'acide kynurénique exerce des effets significatifs contre l'ulcère de stress et diminue les sécrétions gastriques; il est moins efficace pour prévenir les lésions gastriques induites par l'éthanol. Nous pensons que l'acide kynurénique pourrait avoir des effets à la fois périphériques et centraux dans la modulation de la fonction gastrique normale et pathologique.

Introduction

À la fin de l'année 1987, des intoxications atypiques causées par des moules cultivées (*Mytilus edulis* L.) surviennent dans l'est du Canada. Contrairement à ce que l'on observe dans le cas de l'intoxication paralysante par les mollusques, les patients accusent des troubles graves et prolongés du système nerveux central, telles que des pertes de conscience et des défaillances de mémoire, dont certains persistent aujourd'hui. Ce syndrome reçoit le nom de «syndrome d'intoxication amnésiante par les mollusques». De plus, les patients les plus gravement atteints souffrent de troubles gastro-intestinaux graves: nausées, vomissements, hémorragies. Un des sujets décédés avait des ulcères gastriques et duodénaux (communication personnelle, J. Teitelbaum, Institut neurologique de Montréal, 1989).

L'agent responsable de ces intoxications est reconnu comme étant l'acide domoïque[1], un analogue d'un convulsivant, l'acide kaïnique[2]. Chez les patients les plus gravement atteints et ayant survécu, la quantité moyenne d'acide domoïque absorbée est estimée à 86 mg. Les deux patients les plus gravement atteints, qui montraient tous deux des hémorragies digestives, en ont consommé entre 214 et 218 mg respectivement, soit 3,0 et 3,3 mg/kg (communication personnelle, J. Teitelbaum, Institut neurologique de Montréal, 24 février 1989).

Nous avons examiné les effets gastro-intestinaux d'extraits acides de moules toxiques. En raison des effets stimulants sur les récepteurs d'aminoacides neuroexcitateurs signalés pour l'acide domoïque, nous avons également cherché à savoir si l'acide kynurénique, un antagoniste à large spectre de ces récepteurs[3], pourrait réduire les effets gastro-intestinaux indésirables provoqués par la toxine. En outre, nous avons caractérisé le comportement de l'appareil digestif envers l'acide kynurénique chez des rats sains auxquels la toxine n'avait pas été administrée. Une partie de ces travaux a été présentée dans un bref rapport antérieur (voir présentation 18).

Matériel et méthodes

Animaux: Les souris adultes mâles Swiss-Webster (Charles River; 25 g), les jeunes souris mâles et femelles (âgées de 15 jours; de 5 à 10 g) et les rats mâles Sprague-Dawley (*University of Manitoba Central Animal Care Services*, (200 ± 10 g) sujets de ces expériences sont gardés dans un vivarium à température et à lumière constantes (cycle lumière/nuit 12:12; lumière s'allumant à 7 h), avec accès libre à l'eau et à la nourriture.

Agents pharmacologiques: Les extraits de moules sont fournis par le Laboratoire de lutte contre la maladie, Santé et Bien-être social Canada. Il s'agit d'extraits acides de pH 3,6. L'acide kynurénique est fourni par *Sigma Chemical Co.* (St-Louis, MO).

Expérience 1:

Des souris adultes mâles réparties en groupes au hasard reçoivent des injections i.p. d'extraits de moules (0,5, 0,7, 0,8 et 1,0 mL) ou 1,0 mL d'albumine sérique de bovin acidifiée (ASB) comme témoin[4]. On détermine que la DL volume DL84 de l'extrait est de 1,0 mL[4], ce volume sera utilisé dans les expériences ultérieures.

Les souris mortes à la suite de l'injection de l'extrait sont immédiatement autopsiées. L'estomac et le duodénum sont excisés et ouverts le long de la grande courbure et du bord antimésentérique respectivement. Ces tissus sont rinçés à l'eau, préservés dans une solution à 10 p. 100 de formaldéhyde, puis observés sous un microscope à dissection muni d'un micromètre oculaire par une personne qui n'est pas au courant des traitements expérimentaux. On note le nombre et la longueur cumulative (exprimée en millimètres) de tous les ulcères gastriques et duodénaux, ainsi que la présence d'hémorragie ou d'hyperémie dans l'estomac ou le duodénum. On note aussi l'existence d'ascite. Les souris ayant survécu à l'injection sont sacrifiées par luxation cervicale et examinées de la même manière.

Dans les expériences portant sur l'acide kynurénique, celui-ci est administré sous forme de suspension dans le soluté physiologique (0,9 p. 100) en intra-péritonéale à la dose de 300 mg/kg dans un volume de 0,25 mL à différents moments après injection de l'extrait (au bout de 45, 60, 75 ou 90 minutes ou à deux reprises au bout de 15

et 30 minutes). Toutes les souris sont examinées comme il a été décrit ci-dessus.

Expérience 2:

Des souris nouveau-nées reçoivent des injections i.p. uniques d'acide domoïque purifié (Laboratoire de recherches de l'Atlantique, Conseil national de recherches du Canada) aux doses de 0,50, 0,84, 1,0, 4,0 et 8,0 mg/kg. Le soluté physiologique, à un volume comparable (0,05 - 0,10 mL), sert de témoin. Toutes les souris meurent à la suite des injections et sont examinées de la même manière que dans l'expérience 1.

Expérience 3:

Ulcère de stress causé par le froid: On a privé des rats de nourriture (mais non pas d'eau) pendant 24 h avant de les immobiliser dans une pièce froide (de 4 à 6 °C) durant 3 h comme il a été décrit antérieurement[5,6]. Immédiatement avant de subir le stress, les rats répartis en groupes au hasard (n=8 par groupe) ont reçu des injections i.p. de soluté physiologique (volume de 1,0 mL) ou d'acide kynurénique (Sigma) aux doses de 100, 300, 600 ou 1200 mg/kg. Après avoir subi le stress, tous les rats sont décapités et leurs estomacs examinés comme dans les expériences 1 et 2.

Ulcère causé par l'éthanol: On utilise la méthode de Robert et coll.[7]. Les rats privés de nourriture (mais non pas d'eau) depuis 24 h sont répartis en groupes au hasard (n=8 par groupe). On leur administre en i.p. du soluté physiologique ou de l'acide kynurénique, comme ci-dessus. On donne alors à tous les rats, à la seringue de gavage, une dose unique de 1,0 mL d'éthanol à 100 p. 100 (*Canadian Industrial Alcohols*, Corbyville, Ontario). On les remet en cages individuelles sans nourriture ni eau pendant 2 h. Ils sont alors décapités et examinés comme il a été décrit ci-dessus.

Sécrétion d'acide gastrique: On a d'abord implanté des canules gastriques à demeure chez les rats selon une technique décrite antérieurement[8]. Après une période de guérison de 14 jours, on commence à recueillir l'acide gastrique. Chaque jour, les canules sont ouvertes et les estomacs rinçés avec 20 à 30 mL d'eau distillée pour éliminer les aliments résiduels. Toutes les canules drainent pendant 30 minutes après le rinçage. On y attache alors un tube et un flacon pour la cueillette. Celle-ci se fait pendant 3 périodes consécutives de 1 h. La première sert à déterminer le niveau de référence avant l'injection. Au début de la deuxième heure, on change les flacons de cueillette et pratique les injections de soluté physiologique ou d'acide kynurénique aux doses indiquées ci-dessus. Au début de la troisième heure, on change de nouveau les flacons et entreprend une nouvelle cueillette. Tous les rats passent par 6 tels essais de 3 h, espacées de 96 h, dans l'ordre suivant: soluté physiologique, acide kynurénique aux doses de 100 mg/kg, 300 mg/kg, 600 mg/kg et 1200 mg/kg, soluté physiologique de nouveau. Ainsi, chaque animal est son propre témoin, toutes les injections étant précédées et suivies d'une période d'une heure sans injection pour établir le niveau de référence, et tous les rats recevant une injection de soluté tant avant qu'après l'acide kynurénique.

On enregistre le volume des échantillons et les centrifuge à 2500 x g pour en retirer les débris. On détermine le pH et prélève des aliquotes de 1,0 mL qui sont titrées au pH 7,0 par NaDH 0,01 M. Le débit d'acidité est exprimé en mEq/100 g de poids corporel/h.

Résultats

Expérience 1:

Le tableau 1 résume la pathologie gastrique induite par les extraits. Des ulcères gastriques (antraux) sont apparus chez les souris ayant reçu 1,0 mL d'extrait, les ulcères duodénaux chez celles qui en ont reçu 0,7 et 0,8 mL. Une importante ascite s'est produite chez 6 souris sur 12 ayant reçu 1,0 mL d'extrait, soit beaucoup plus que dans tous les autres groupes ($\chi^2(4)=26,6$; $p<0,01$).

Le tableau 2 résume les effets de l'acide kynurénique sur la pathologie gastrique induite par les extraits. Chez les souris auxquelles on l'a administré 60 ou 75 minutes après l'extrait, on ne note aucune manifestation d'ulcères ou d'ascite; un seul cas d'hyperémie duodénale est observé chez une souris

Tableau 1.
Production de lésions gastro-intestinales chez la souris par l'extrait de moules

Groupe	Ulcères gastriques			Ulcères duodénaux			Ascite
	Survenue	Nombre (M± é.t.)	Longueur (mm)	Survenue	Nombre (M± é.t.)	Longueur (mm)	
Témoin ASB	0/12	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0/12	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0/12
Extrait 0,5 mL	0/12	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0/12	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0/12
Extrait 0,7 mL	0/10	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0/10	0,1(0,01)	0,1(0,01)	0/10
Extrait 0,8 mL	0/18	0,0(0,0)	0,0(0,0)	2/18	0,2(0,1)	0,4(0,1)	0/18
Extrait 1,0 mL	3/12	0,5(0,1)	1,1(0,3)	0/10	0,0(0,0)	0,0(0,0)	6/12*

* Fréquence nettement supérieure à celle de tous les autres groupes

traitée au bout de 75 minutes. Dans le cas de l'acide kynurénique administré au bout de 45 ou 90 minutes ou à deux reprises au bout de 15 et 30 minutes, on observe des ulcères gastriques, de l'hyperémie duodénale et de l'ascite. La survenue de celle-ci est beaucoup plus fréquente que chez les témoins traitées à l'ASB, tant dans le groupe traité au bout de 90 minutes que dans le groupe traité au bout de 15 et 30 ($\chi^2(5)=18,8$; $p<0,01$).

Expérience 2:

Le tableau 3 résume les effets de l'acide domoïque pur sur la pathologie gastrique chez de jeunes souris. Bien qu'aucun ulcère gastrique ou duodénal franc n'ait été observé, les plus fortes doses d'acide domoïque utilisées (4,0 et 8,0 mg/kg) ont entraîné une survenue de saignements gastro-intestinaux nettement supérieure à celle des témoins ($p<0,05$). Les saignements gastriques ne sont observés chez aucune souris témoin; on les voit chez un seul animal ayant reçu la dose la plus faible (0,50 mg/kg).

Expérience 3:

Le tableau 4 résume les lésions gastriques provoquées par le stress dû au froid. L'acide kynurénique exerce un effet anti-ulcère significatif ($F(4,35)=4,92$; $p<0,01$). À toutes les doses, l'acide kynurénique diminue de façon significative la gravité des lésions (longueur cumulative des ulcères) par rapport au groupe témoin traité au soluté physiologique ($p<0,01$); aux doses de 100, 300 et 600 mg/kg il atténue de façon significative la fréquence des lésions dans l'estomac glandulaire de ces rats stressés par le froid. La protection maximale contre les atteintes gastrites causées par le stress s'obtient avec les doses moyennes (réduction de 72, 56 et 68 p. 100 de la longueur cumulative des ulcères par les doses de 100, 300 et 600 mg/kg respectivement).

Le tableau 5 résume les données des lésions gastriques induites par l'éthanol. De nouveau, l'acide kynurénique montre un effet anti-ulcère significatif ($F(4,35)=3,98$; $p<0,04$), mais moins frappant. Seules les doses de 600 et 1200 mg/kg d'acide kynurénique diminuent de façon significative la gravité des lésions provoquées par l'éthanol par rapport aux témoins ($p<0,05$ et 0,01 respectivement). L'effet protecteur à l'égard des lésions causées par l'éthanol est moins important qu'à l'égard des lésions causées par le stress (réduction de 6, 5 et 24 p. 100 pour les lésions causées par l'éthanol pour les doses de 100, 300 et 600 mg/kg respectivement, contre une réduction de 72, 56 et 68 p. 100 pour les lésions causées par le stress à ces mêmes doses).

Le tableau 3 résume les effets de l'acide kynurénique sur la production basale d'acide gastrique chez les rats conscients. Il la réduit de façon

Tableau 2.
Effets de l'acide kynurénique (300 mg/kg) sur les lésions gastro-intestinales induites par des extraits de moules (1,0 mL) chez la souris

Groupe	Survenue des ulcères gastriques	Nombre d'ulcères (M± é.t.)	Longueur des ulcères (mm)	Ascite	Hyperémie duodénale
ASB-90 min-KYN	0/10	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0/10	0/10
Extrait-90 min-KYN	2/15	0,1(0,1)	0,1(0,1)	3/15*	0/15
Extrait-75 min-KYN	0/10	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0/10	1/10
Extrait-60 min-KYN	0/10	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0/10	0/10
Extrait-45 min-KYN	1/10	0,1(0,1)	0,2(0,1)	2/10	2/10
Extrait-15 min-KYN	0/10	0,0(0,0)	0,0(0,0)	5/10*	0/10

* Fréquence nettement supérieure à celle des témoins ASB-90 min-KYN

Tableau 3.
Effets de l'acide domoïque pur sur le saignement gastro-intestinal chez de jeunes souris

Traitement	Survenue des saignements G.-I.
Soluté physiologique	0/4
DOM 0,50 mg/kg	1/4
DOM 0,84 mg/kg	0/4
DOM 1,00 mg/kg	0/4
DOM 4,00 mg/kg	3/4*
DOM 8,00 mg/kg	2/4*

* Taux nettement supérieurs à ceux des témoins: χ^2:$p<0.05$

significative ($F(5,35)=6,65$; $p<0,001$). Il le fait à toutes les doses dans l'heure qui suit immédiatement l'injection, par rapport à la ligne de référence pré-injection ($p<0,01$). De plus, l'acide kynurénique aux doses de 600 et 1200 mg/kg détermine une baisse soutenue de la production d'acide gastrique qui persiste dans la deuxième heure suivant l'injection ($p<0,01$).

Discussion

Les chercheurs de Santé et Bien-être Canada ont identifié un puissant agoniste des récepteurs des aminoacides neuroexcitateurs, l'acide domoïque[9], comme le principal toxique responsable de l'intoxication amnésiante par les mollusques survenue en 1987 dans l'est du Canada[1]. Ce syndrome est caractérisé par une série de graves symptômes digestifs suivis d'une dysfonction prolongée du système nerveux central. Dans notre expérience 1, les extraits provoquent de façon évidente des ulcères gastriques (antraux), des lésions et une hyperémies duodénales, ainsi que de l'ascite. L'acide kynurénique, un puissant antagoniste des récepteurs des aminoacides neuroexcitateurs[3], administré à différents moments après l'extrait, bloque les effets gastro-intestinaux indésirables. En comparant les données figurant au tableau 2 et celles du tableau 1 pour le groupe ayant reçu une dose de 1,0 mL d'extrait, on voit que l'acide kynurénique administré à n'importe quel moment après l'extrait diminue de façon significative la survenue et la longueur des ulcères gastriques induits par les extraits. Cette protection est compatible avec celle que l'acide kynurénique exerce contre la neurotoxicité des extraits de moules contaminées par l'acide domoïque chez la souris (voir présentation 18).

C'est bien l'acide domoïque qui cause les lésions gastriques, comme on l'a observé dans l'expérience 1 et comme le montrent les résultats de l'expérience 2, dans laquelle de jeunes souris ont reçu des doses variables d'acide domoïque pur. On a utilisé des jeunes souris pour ces travaux parce que les approvisionnements mondiaux en acide domoïque sont très limités et que nous n'en disposions que d'une très faible quantité. On observe clairement des hémorragies gastriques et des hyperémies chez la plupart des souris ayant reçu les plus fortes doses d'acide domoïque. On n'a pas observé d'ulcères francs, probablement parce que les souris sont mortes peu de temps après l'injection, ce qui a coupé court à l'évolution des lésions. Tout de même, ces données correspondent remarquablement aux observations cliniques faites chez les personnes ayant souffert de conséquences gastro-intestinales indésirables après l'ingestion de moules toxiques. Tout porte donc à croire que les intoxications induites par les moules observées dans l'est du Canada à la fin de 1987 étaient bien dues à l'acide domoïque.

L'acide kynurénique montre un effet important contre les lésions gastriques induites par le stress, un effet moindre contre les lésions induites par l'éthanol et un effet important contre l'acidité des sécrétions gastriques chez le rat. Les ulcères induits par l'éthanol proviennent d'une combinaison de lésions massives de l'épithélium touchant à la lumière[10] et de troubles de l'hémostase gastrique[11], tandis que les ulcères de stress résultent probablement d'une hypersécrétion acide et d'anomalies de la motilité gastrique[5,6,12]. Il apparaît donc que la plus grande efficacité de l'acide kynurénique contre les ulcères de stress que contre les ulcères induits par l'éthanol vient de son effet sur la sécrétion gastrique. Elle pourrait

Tableau 4.
Effets de l'acide kynurénique sur la formation d'ulcères de stress causé par le froid chez le rat

Traitement	Nombre d'ulcères (M± é.t.)	Longueur cumulative des ulcères (mm)
Soluté physiologique	15,0 (1,0)	37,0 (1,0)
KYN - 100 mg/kg	8,0 (0,9)*	10,2 (1,7)**
KYN - 300 mg/kg	9,2 (0,9)*	16,4 (2,8)**
KYN - 600 mg/kg	6,4 (1,5)**	11,8 (1,9)**
KYN - 1200 mg/kg	15,0 (2,1)	20,3 (3,7)**

* Longueur nettement inférieure à celle des témoins $p<0,05$
** Longueur nettement inférieure à celle des témoins $p<0,01$

Tableau 5.
Effets de l'acide kynurénique sur les ulcères induits par l'éthanol chez le rat (moyenne ± écart-type)

Traitement	Nombre d'ulcères	Longueur cumulative des ulcères (mm)
Soluté physiologique	13,2 (1,9)	74,8 (13,1)
KYN - 100 mg/kg	14,5 (1,9)	70,3 (3,4)
KYN - 300 mg/kg	12,8 (2,2)	71,0 (12,9)
KYN - 600 mg/kg	9,4 (1,2)*	56,8 (4,4)*
KYN - 1200 mg/kg	10,0 (1,6)	38,6 (2,2)**

* Longueur nettement inférieure à celle des témoins; $p<0,05$
** Longueur nettement inférieure à celle des témoins; $p<0,01$

également s'expliquer par l'absence de participation des prostaglandines dans l'action anti-ulcère de l'acide kynurénique dans le tube digestif. Des observations non publiées font penser que l'inhibition de la prostaglandine-synthétase par un traitement préalable à l'indométhacine ne modifie pas les effets protecteurs de l'acide kynurénique contre les lésions gastriques, ni dans les ulcères de stress ni dans les ulcères causés par l'éthanol.

Il faut noter qu'administré aux doses de 500 et 1200 mg/kg l'acide kynurénique inhibe de façon remarquable la production d'acide gastrique pendant au moins les 2 h qui suivent l'injection. Puisqu'on on ne peut pas laisser des canules gastriques ouvertes plus de 3 h chez le rat sous peine de causer la déshydratation de l'animal, il reste encore à déterminer la durée complète de cet effet. Nous poursuivons aussi les recherches pour déterminer si l'acide kynurénique est efficace contre la production d'acide gastrique stimulée chez le rat par le béthanéchol, l'histamine et la pentagastrine.

La question se pose également de savoir si l'acide kynurénique agit de façon centrale ou périphérique. Il est bien établi que c'est un antagoniste à large spectre des récepteurs des aminoacides excitateurs centraux[13]. Il reste à déterminer si ces récepteurs existent en périphérie, en particulier dans le tube digestif, quoique des rapports préliminaires suggèrent l'existence de récepteurs du N-méthyl-D-aspartate dans l'iléon du cobaye[14]. Il ne semble donc pas déraisonnable de supposer que l'acide kynurénique possède au moins quelques sites d'action périphériques. De plus, comme c'est un antagoniste non sélectif des récepteurs d'aminoacides neuroexcitateurs, nous ne pouvons pas encore lui reconnaître un site d'action spécifique. Cependant, nous examinons actuellement des antagonistes des récepteurs d'aminoacides excitateurs plus sélectifs[15] quant à leur capacité de bloquer les effets toxiques induits par les extraits.

Références

1. Boyd R, Hogge L, Jamleson W, et coll. *The role of mass spectrometry combined with reversed phase HPLC in the identification of an unusual shellfish toxin*. Proc Amer Soc Mass Spec 1988; 36: 165.
2. Zaczek R, Coyle J. *Excitatory amino acid analogues: neurotoxicity and seizures*. Neuropharmacol 1982; 21: 15-26.
3. Germano I, Pitts L, Meldrum B, Bartkowski H, Simon R. *Kynurenate inhibition of cell excitation decreases stroke size and deficits*. Ann Neurol 1987; 22: 730-734.
4. Bose R, Glavin G, Pinsky C. *Neurotoxicity and lethality of toxic extracts from Atlantic coast shellfish*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 1989; 13: 559-562.
5. Glavin G. *Restraint ulcer: history, current research and future implications*. Brain Res Bull 1980; 5: 51-58.
6. Pare W, Glavin G. *Restraint stress in biomedical research: a review*. Neurosci Biobehav Rev 1986; 10: 339-370.
7. Robert A, Nemzals J, Lancaster C, Hanchar A. *Cytoprotection by prostaglandins in rats*. Gastroenterol 1979; 77: 433-443.
8. Pare W, Isos X, Vincent G, Glavin G. *A technique for chronic gastric fistula preparation in the rat*. Lab Anim Sci 1977; 27: 244-247.
9. Biscoe T, Evans R, Headley P, Martin R, Watkins J. *Domoic and quisqualic acids as potent amino acid excitants of frog and rat spinal neurons*. Nature 1975; 255: 166-167.
10. McNaughton W, Williamson T, Morris G. *Adaptive cytoprotection by 0.25 N HCl is truly "cytoprotective" and may not depend upon elevated levels of prostaglandin synthesis*. Can J Physiol Pharmacol 1988; 66: 1075-1081.
11. Yonei Y, Guth P. *Laparotomy stimulates an endogenous gastric mucosal protective mechanism in the rat*. Gastroenterol 1988; 95: 600-611.

Tableau 6.
Effets de l'acide kynurénique sur la sécrétion d'acide gastrique basale (non stimulée) chez le rat en mEq/100 g/h (moyenne ± écart-type)

Traitement	1ère heure	2ème heure	3ème heure
Soluté physiologique	16,2 (0,8)	15,9 (0,3)	16,1 (0,6)
KYN - 100 mg/kg	14,9 (2,2)	11,8 (0,7)*	15,7 (1,1)
KYN - 300 mg/kg	17,8 (2,1)	7,3 (0,2)**	16,3 (1,8)
KYN - 600 mg/kg	16,5 (1,3)	5,2 (0,1)**	10,8 (1,0)*
KYN - 1200 mg/kg	16,0 (1,8)	5,1 (0,1)**	9,9 (0,8)*
Solution saline	15,7 (1,0)	16,3 (1,1)	16,5 (0,9)

* Nettement inférieure que durant la 1ère heure; $p<0,05$
** Nettement inférieure que durant la 1ère heure; $p<0,01$

12. Garrick T, Buack S, Sass P. *Gastric motility is a major factor in cold restraint-induced lesion formation in rats*. Amer J Physiol 1986; 250: G191-G199

13. Robinson M, Anderson K, Koerner J. *Kynurenic acid as an antagonist of hippocampal excitatory transmission*. Brain Res 1984; 309: 119-126.

14. Sawyer B, Shannon H. *N-methyl-D-aspartate receptors in the guinea pig ileum myenteric plexus*. The Pharmacol 1988; 30: A184.

15. Honore T. *Exicitatory amino acid receptor subtypes and specific antagonists*. Med Res Rev 1989; 2: 1-23.

Discussion

J. Olney : Je crois que vous devriez communiquer avec d'autres collègues canadiens, Pat et Edith MacGreer de Vancouver, qui ont d'abord injecté de l'acide kaïnique dans les ventricules cérébraux et ont trouvé, je crois, des ulcérations. Il y avait également une hémorragie dans les voies urinaires et une forme quelconque de cardiopathie. Je crois que leurs constatations portaient sur ces trois organes, et pourtant l'acide kaïnique avait été injecté directement dans le cerveau et nulle part ailleurs dans l'organisme.

G. Glavin : Je vous remercie du renseignement et j'en prends bonne note. Il n'est pas étonnant qu'il y ait eu certaines lésions rénales et, peut-être, une hémorragie rénale, mais il faudra que je vérifie ce travail en détail et que je le compare avec les travaux de mon collègue de l'*University of Western Ontario*.

22. Discussion du groupe d'experts : traitement

J. Olney, J. Teitelbaum, C. Pinsky, G. Debonnel

J. Olney : J'aimerais ouvrir la discussion en signalant qu'il est très important à mon avis d'essayer de définir le rôle des convulsions dans la production des lésions et dans la symptomatologie clinique, aussi bien aiguë que chronique. Si les convulsions sont causes d'une bonne partie de l'atteinte neuropathologique et des symptômes cliniques et comportementaux qui en découlent, l'approche thérapeutique pourrait alors être très différente de ce que l'on verrait si l'atteinte neuropathologique était attribuable à un autre mécanisme. Si les lésions sont essentiellement provoquées par les convulsions, le mode thérapeutique le plus efficace, c'est-à-dire le traitement de choix, consisterait alors à utiliser l'agent anticonvulsivant le plus efficace que l'on peut trouver. Mais si l'atteinte neuropathologique survient indépendamment des convulsions, il serait alors très bien de trouver un autre moyen de prévenir l'atteinte neuropathologique. J'aimerais donc ouvrir le débat sur une tentative de clarifier ce point, et je me demande si ceux d'entre vous qui avez étudié l'intoxication par l'acide domoïque, que ce soit chez les animaux de laboratoire ou chez des êtres humains, avez été en mesure de tirer une conclusion provisoire quant au rôle des convulsions dans la production des lésions.

J. Teitelbaum : Je pense que je pourrais parler des aspects cliniques. Chez les malades les plus gravement atteints, on trouve une plus grande proportion de personnes ayant eu des convulsions que chez les personnes moins gravement affectées. Ce n'est pas que tous les malades qui ont été gravement affectés aient eu des convulsions. Je crois qu'il est important de signaler, uniquement du point de vue du clinicien, qu'il y a eu des occasions où nous ne nous sommes pas rendu compte que les malades avaient des convulsions. Seul l'EEG montrait des anomalies diffuses; dans un cas, le débat a été si passionné que j'ai été forcée d'amener un malade dans la salle d'EEG et de lui administrer du Valium pour voir si le tracé changerait, avant que nous réalisions qu'il avait effectivement des crises psychomotrices. Ainsi, il est possible que les convulsions jouent un rôle plus important du point de vue clinique que nous ne l'avons d'abord pensé.

J. Olney : Je crois qu'il s'agit d'un point très important. J'étais curieux de savoir si les cliniciens qui traitaient ces malades en étaient conscients. Chez les animaux de laboratoire traités à l'acide kaïnique, le syndrome convulsif est relativement léger et si vous administrez du MK-801, vous pouvez prévenir les manifestations comportementales de ces crises, mais si vous implantez des électrodes profondes dans diverses parties du cerveau, vous constatez que l'activité épileptoïde se poursuit. Ainsi, il est possible d'être vraiment induit en erreur si l'on se fie uniquement à l'observation clinique pour déterminer s'il y a une importante activité épileptoïde dans le cerveau. J'ai l'impression que l'atteinte neuropathologique causée par l'acide kaïnique est presque entièrement attribuable aux convulsions et je ne serais pas étonné qu'il en soit de même pour l'acide domoïque; si tel devait être le cas, il nous faudra alors employer nos efforts à trouver le meilleur anticonvulsivant. Peut-être est-il possible de mettre les malades à l'abri pendant la durée de la période aiguë avec un bon anticonvulsivant, ce qui empêcherait les convulsions jusqu'à ce que l'acide domoïque soit éliminé de l'organisme; peut-être qu'ainsi on leur épargnera les lésions cérébrales.

C. Pinsky : Nous nous sommes posés exactement la même question et, à cet égard, j'ai apporté une diapositive. Nous avons fait l'expérience juste à temps pour faire la diapositive. Si je peux la montrer, je crois qu'elle pourrait présenter un certain intérêt.

J. Olney : Certainement.

C. Pinsky : La voici. Nous étions en train d'essayer de discerner les différences entre la létalité et la toxicité (pour ce qui est de provoquer les convulsions) de l'acide domoïque chez la souris, que nous avons utilisée comme notre préparation de choix pour plusieurs raisons que vous avez entendues aujourd'hui. Nous avons décidé d'enregistrer les EEG de la souris maintenue en contention relativement légère et vous en voyez ici un exemple. Cela nous permet de réaliser des expériences sur le même animal, pour l'instant d'une manière semi-chronique, mais à l'avenir d'une manière chronique, de sorte que nous puissions répéter les expériences et suivre la progression de l'atteinte neuropathologique lorsque nous aurons modifié nos expériences à cette fin. Ce que vous voyez ici, dans le tracé du haut, est un enregistrement témoin. C'est l'EEG d'une souris de 10 grammes avant l'injection d'un extrait toxique. Laissez-moi ajouter que cette souris est tranquillisée à l'aide d'une petite quantité de diazépam. Alors, s'agit-il d'un EEG normal de souris ou non, je n'en sais rien, mais je me demande si quelqu'un peut dire ce qu'est un EEG normal de souris. Disons simplement qu'il s'agit de l'EEG d'une souris à qui on a donné une dose tout juste tranquillisante, et non sédative et non anticonvulsivante, de diazépam. Trois minutes plus tard, nous avons injecté un extrait hépatopancréatique de moules toxiques; dans les 10 minutes qui ont suivi cette injection par voie intrapéritonéale, nous avons commencé à voir des pics sur l'EEG et, au bout de 37 minutes, cette activité était assez constante. S'il n'y a pas d'autre intervention, cette activité se poursuit et augmente en fréquence, les pics deviennent plus prononcés et plus fréquents. Je dois signaler que durant toute la durée de cette activité «convulsive», la souris est absolument immobile et semble être dans un état de sédation ou de sommeil. Même pas la moindre secousse musculaire, bien qu'on puisse observer une certaine raideur de la queue et, parfois, une vibration de cette queue, mais ce sont là les seules indications que la souris est dans un certain état d'excitation. Juste pour vous donner une autre illustration de l'action de l'acide cynurénique, on voit ici l'effet de ce produit administré à raison de 300 mg/kg à cette même souris

47 minutes après l'administration de l'extrait toxique. Vingt minutes plus tard, l'activité dans l'EEG commence à diminuer; les pics sont beaucoup moins fréquents et beaucoup plus petits. Deux minutes plus tard, les pics ont presque complètement disparu. Cette diapositive illustre le type d'expérience que l'on peut maintenant effectuer avec les enregistrements chroniques ou semi-chroniques et nous avons réussi à faire dans cette seule expérience ce qui, dans d'autres circonstances, aurait nécessité un grand nombre de souris. Nous pouvons maintenant le faire avec une souris et répéter les expériences sur la table. Incidemment, si on n'administre pas d'acide cynurénique, les pics deviennent plus grands et plus fréquents. Je ne peux le montrer aujourd'hui, mais nous avons des expériences détaillées pour le montrer et je pense que cela démontre que l'acide cynurénique prévient l'activité épileptoïde, ce que le diazépam ne fait pas. Ainsi, il semblerait qu'il y ait une activité épileptoïde considérable qui précède les signes patents de toxicité, à savoir les convulsions motrices, et la mort que nous croyons évidemment liée à l'atteinte neuropathologique.

J. Olney : Quelle dose de diazépam avez-vous utilisée?

C. Pinsky : Dans ce cas, l'intervention et l'implantation des électrodes se font sous anesthésie à l'éther. Quand l'effet de l'éther se dissipe, ce qui se fait assez rapidement, nous administrons du diazépam à raison de 10 mg/kg et, à l'occasion, si l'expérience dure longtemps – disons au bout de 4 h – nous devons ajouter une autre dose de 5 mg/kg. Mais la concentration de 10 mg/kg est seulement une valeur prudente. Nous avons à peu près les mêmes résultats avec une dose de 5 mg/kg et cette quantité de diazépam ne prévient jamais les convulsions, même lorsque le produit est administré au moment optimal avant l'administration de l'extrait comme l'a montré ce matin le D[r] Bose. Nous avons eu besoin d'une dose beaucoup plus élevée pour prévenir les convulsions.

J. Olney : Chez le rat traité à l'acide kaïnique, une dose de 25 mg/kg de diazépam a été utilisée; cette dose a permis de prévenir les convulsions et les lésions cérébrales.

C. Pinsky : Est-ce que l'administration a eu lieu à un moment particulier avant ou après l'administration de l'acide kaïnique?

J. Olney : Habituellement, cette dose a été administrée avant, mais en fait, nous avons fait des expériences dans lesquelles nous voulions laisser l'acide kaïnique endommager le cerveau et, ensuite, faire cesser les crises à un certain moment. Nous avons donné du diazépam 2, 3, 4 h après l'apparition des crises et nous avons pu les faire cesser et permettre à l'animal de survivre. Autrement, les animaux auraient sans doute fini par mourir.

C. Pinsky : Bien, nous voyons ici une très grande différence entre l'acide kaïnique et l'acide domoïque. Nous ne pouvons arrêter une crise causée par l'acide domoïque même avec une dose élevée de diazépam administrée après l'injection.

J. Olney : Vous pouvez ou vous ne pouvez pas?

C. Pinsky : Nous ne pouvons pas. Le produit doit être administré avant le traitement à l'acide domoïque.

J. Olney : Je pense que les autres questions que nous devrions aborder ont trait aux types de récepteurs d'acides aminés excitateurs qui pourraient servir de cibles à l'intervention thérapeutique et, encore une fois, j'aimerais signaler que bien que l'acide domoïque puisse agir strictement sur les récepteurs de l'acide kaïnique pour déclencher les phénomènes neuropathologiques, il est possible que les récepteurs du N-méthylaspartate entrent en jeu d'une manière ou d'une autre. Ainsi, on pourrait vouloir prendre ceux-ci pour cible à un moment donné, mais je ne suis pas sûr que ce type d'approche finira par devenir le mode thérapeutique de choix ou si nous allons considérer les convulsions comme la cible principale de la thérapie. Quelqu'un a-t-il des idées sur la question? Est-ce que le D[r] Novelli est présent? Peut-être peut-il nous dire s'il croit préférable d'orienter la thérapie vers les récepteurs du N-méthylaspartate ou vers les récepteurs de l'acide kaïnique.

A. Novelli : Je me souviens qu'il y a un certain temps, le D[r] Olney songeait à utiliser le MK-801 pour assurer une protection contre les effets neurotoxiques du glutamate chez les malades exposés à une agression ischémique après un arrêt cardiaque. Je serais très intéressé à lire votre article dans *Science*, vu l'effet que vous avez prévu dans le cas de la phencyclidine qui, si je ne me trompe pas, ne protègerait que dans une certaine mesure et non totalement. Je crois qu'à l'heure actuelle il n'est pas encore clair s'il est possible de contrer les effets au niveau des récepteurs du NMDA d'une manière très efficace, même en utilisant un médicament comme le MK-801 qui, au départ, semblait si prometteur.

J. Olney : Je devrais probablement vous montrer certaines images des altérations provoquées par le MK-801 et la phencyclidine. J'ai quelques diapositives. Voici un neurone, il y en a un autre ici, et remarquez la présence de formations sombres dans les vacuoles. Je crois que ce sont des mitochondries qui sont en train d'être incorporées à l'intérieur des vacuoles. Les vacuoles sont probablement formées à partir du réticulum endoplasmique. Ici, maintenant, cette image a été prise quatre heures après l'administration de MK-801 et les vacuoles sont beaucoup plus grandes; et si vous regardez dans l'ensemble du cytoplasme de cette cellule nerveuse, il est difficile de trouver une mitochondrie normale. Il semble qu'elles aient toutes été englouties et qu'elles soient en train de subir un processus quelconque de dissolution. Étonnamment, il semblerait que ce type de réaction soit réversible. Je dis étonnamment parce que je croyais que si nous ne faisions que poursuivre l'administration du MK-801, nous rendrions la réaction progressive et, finalement, irréversible. Mais il semble y avoir un mécanisme quelconque par lequel la cellule devient tolérante au MK-801 et qui débranche le mécanisme toxique quel qu'il soit. On a beau continuer d'administrer du MK-801, plus rien ne se produit. Cependant, la situation devient de plus en plus compliquée parce qu'on peut obtenir le même effet avec des antagonistes compétitifs du NMDA, et ces composés agissent sur un récepteur totalement différent. Mais le récepteur de NMDA sur lequel les antagonistes compétitifs agissent n'aura pas nécessairement le même mécanisme de tolérance. Nous n'avons pas mis cette hypothèse à l'épreuve, mais il est possible que les phénomènes soient irréversibles.

(Le Dr Olney, qui doit s'absenter, est remplacé à la présidence par le Dr Debonnel).

G. Debonnel : À la lumière de ce que vient de dire le Dr Olney, je crois qu'il serait bon d'avoir un antagoniste de la NMDA, mais ce serait certainement un problème que d'avoir ce type de lésion. J'aurais aimé pouvoir demander au Dr Olney s'il a obtenu les mêmes effets avec la kétamine, qui agit également sur le récepteur de PCP 1 et qui est une substance déjà utilisée par les anesthésistes, ce qui en fait un produit facilement accessible pour ce type de malade. J'ignore si on aurait le même type de problème avec la kétamine, mais peut-être que ce pourrait être une façon intéressante de bloquer le récepteur du NMDA sans avoir ce problème.

A. Novelli : Puis-je faire une observation? Il semblerait, d'après ce qu'a dit le Dr Olney, qu'une activation tonique du récepteur du NMDA soit nécessaire pour le fonctionnement normal du neurone. Ce fait est très intéressant pour moi parce que du point de vue de la culture cellulaire, il semble que ce soit également vrai pour la bonne conservation de la culture que j'utilise. Ces cellules ont besoin d'une stimulation glutamatergique, une stimulation glutamatergique très subliminaire, pour qu'elles puissent continuer de survivre en culture pendant 30, 40 jours. Si vous ne fournissez pas cette stimulation, les cellules meurent beaucoup plus rapidement. Ainsi, je ne sais pas s'il y a une corrélation quelque part, mais je pense qu'il s'agit d'une idée intéressante.

Observation provenant de la salle : Je voudrais seulement faire certaines observations sur l'ischémie étudiée chez des animaux entiers par rapport à vos observations sur la kétamine. Les résultats du MK-801 et de la kétamine sur l'ischémie peuvent fournir une ligne directrice assez vague, bien que dans l'ischémie, vous ayez certainement des situations physiopathologiques différentes et qu'il semble y avoir beaucoup de controverses entre les nombreux laboratoires. Certains laboratoires ont montré que le MK-801 est efficace avant et après la survenue de l'ischémie chez différents animaux, alors que d'autres laboratoires n'ont pas été capables de reproduire ces résultats. Dans notre laboratoire, nous avons trouvé que l'administration de MK-801 pendant une période de temps allant jusqu'à 20 minutes après la survenue de l'ischémie est efficace pour prévenir la neuronécrose ischémique quantifiée. En ce qui concerne la kétamine, vous vous rappelez que le Dr Olney nous a montré une diapositive sur laquelle les produits étaient classés selon leur puissance, et la kétamine y était reconnue comme étant un antagoniste non compétitif beaucoup moins puissant que le MK-801. Nous n'avons observé aucun effet de la kétamine et la plupart des groupes qui ont étudié ce produit, et ils sont moins nombreux que ceux qui étudient le MK-801, n'en ont pas trouvé non plus.

G. Debonnel : L'an dernier, au *Neuroscience Meeting*, nous avons présenté des résultats sur l'interaction des récepteurs sigma et des récepteurs de PCP 1. Si donc, pour des raisons toxicologiques, on ne peut utiliser le MK-801, peut-être pouvons-nous seulement potentialiser l'effet de la kétamine sur le récepteur PCP 1 par l'intermédiaire d'une action sur le récepteur sigma. Par exemple, de très faibles doses d'Haldol® permettent de potentialiser environ 10 fois l'effet du MK-801. Nous n'avons pas essayé ceci avec la kétamine, mais nous avons d'excellentes chances de trouver exactement le même effet.

A. Gjedde : J'aimerais dire que la question du MK-801 semble commencer à se clarifier parce que l'effet du MK-801 semble s'exercer contre une ischémie focale expérimentale. Ce produit, administré après l'agression ischémique, est capable de réduire la taille de l'infarctus, tandis que dans le cas d'une ischémie globale, d'une anoxie, je pense que l'idée qui rallie le plus de gens à l'heure actuelle, c'est que l'effet est très controversé. Dans le cas de l'ischémie focale, le produit se lie seulement aux récepteurs activés, ce qui signifie que c'est presque un boulet magique qui se dirige tout droit sur les neurones dont le site de fixation a été exposé, ce qui est très différent de l'effet que l'on observerait sur les neurones normaux où il n'y a pas eu d'agression avant l'administration du MK-801. Je crois qu'il est très important de garder cette distinction à l'esprit et je pense que le seul endroit où il y a maintenant une preuve irréfutable d'effets, c'est dans l'ischémie focale.

Observation provenant de la salle : Albert, j'ignore si vous considérez l'occlusion carotidienne bilatérale comme étant focale, du fait qu'il s'agit seulement du prosencéphale, ou global, du fait qu'il s'agit des deux hémisphères, mais nous avons trouvé que dans le cas de l'occlusion carotidienne bilatérale, nous obtenons très certainement un effet. En ce qui concerne les lésions que le Dr Olney vient de nous montrer, je ne crois pas que nous devrions les considérer comme un obstacle sérieux aux agents thérapeutiques. Il s'agit de petites lésions infracellulaires, ultrastructurales, qui sont réversibles et on sait bien qu'il existe des lésions beaucoup plus graves que celles-là qui sont réversibles, par exemple la transformation neuronale «sombre» que l'on observe dans les tissus fixés à l'aldéhyde; c'est pourquoi je ne crois pas que nous devrions considérer ces lésions comme interdisant l'utilisation du MK-801.

I. Hynie : Je me demande s'il est juste de dire que seul le diazépam a semblé avoir une certaine valeur chez les malades. Il semble que ce soit une question à traiter dans le cadre des recherches futures, étant donné que, de toute évidence, il reste beaucoup de travail à faire *in vitro* sur les animaux, et peut-être qu'en cours de route on parviendra à mettre au point des applications pour l'être humain. Il est probable que cette question devrait être traitée sous la rubrique priorités de recherche, qui est essentiellement le sujet de la prochaine discussion du groupe d'experts, mais j'aimerais poser la question suivante : y a-t-il autre chose, à part le Valium, dont l'utilisation chez l'homme soit déjà approuvée et qui pourrait dès maintenant être recommandé sans danger pour le traitement d'un cas connu d'intoxication par l'acide domoïque? Je pense que la réponse est négative, mais je serais très heureux que quelqu'un vienne me dire que je suis dans l'erreur.

G. Debonnel : J'aimerais simplement ajouter que même s'il n'y a pas de signes cliniques de convulsion, je crois qu'il est très important que tous ces malades passent un EEG pour savoir s'il n'y a pas de crises épileptique en cours. Parce que, comme l'a affirmé le Dr Olney, et comme nous avons eu l'occasion de le constater chez les rats qui ont reçu de

l'acide domoïque par voie intraveineuse sous anesthésie, il n'y a absolument aucun signe de convulsion du point de vue de la motricité, alors qu'un enregistrement électrophysiologique de la région CA3 permet de constater facilement qu'une activité de nature épileptique se déroule sans aucun signe moteur extérieur. Ainsi, je crois qu'il serait très important que tous ces malades passent régulièrement un EEG afin que l'on puisse s'assurer qu'il n'y a pas de crises.

J. Teitelbaum : Il y a même une autre difficulté : les crises ne sont pas toujours décelables sur l'EEG, surtout si elles sont d'origine limbique, ce qui est vraisemblablement le cas. C'est le cas chez les animaux de laboratoire et parfois, chez l'être humain, vous n'arrivez pas toujours à les enregistrer sur l'EEG, selon l'endroit où vous avez placé vos électrodes, si vous avez des électrodes sphénoïdales ou non. Je crois que pour moi, si un malade se présentait maintenant, j'aurais probablement recours à l'administration de Valium au goutte-à-goutte même sans la mise en évidence d'une activité épileptoïde. Même si le tracé était tout juste anormal, avec des ondes lentes, cela me serait suffisant pour entreprendre le traitement.

C. Pinsky : Je dois abonder dans le même sens, à cause du point de vue théorique et à cause de ce que nous avons vu au cours de l'expérimentation animale, mais je me rends compte qu'il faudrait probablement recourir à une surveillance en salle de réanimation, parce que je crois que ce que nous avons trouvé, c'est qu'il faudrait administrer le diazépam à des concentrations proches de celles qui entraînent une dépression respiratoire, ce qui signifie qu'il faut être prêt à intervenir de manière à fournir une assistance respiratoire et, très certainement, il faudrait surveiller le malade de manière continue, mais il reste que cela est mieux que l'autre corne du dilemme.

Observation provenant de la salle : Je pense que nous nous entendons tous, mais encore une fois, si l'on revient à l'ischémie, nous avons administré du Valium dans le cas de l'ischémie et avons constaté une diminution de la survenue des crises chez le rat, amélioré le taux de mortalité et diminué les lésions histologiques, même si le Valium est administré 20 minutes après l'ischémie. On peut lire dans le *Journal of Neurology* que Kromholtz et coll. ont étudié l'activité épileptique chez les malades atteints d'une ischémie globale; ils ont constaté que ceux qui ont eu des crises prolongées étaient plus mal en point; non pas ceux qui avaient eu un peu de crises, mais ceux qui ont eu des crises prolongées.

G. Debonnel : J'aimerais tout juste ajouter ceci : je sais que les cliniciens sont parfois craintifs lorsqu'il s'agit d'administrer des doses élevées de benzodiazépam, mais j'aimerais simplement leur rappeler que plusieurs études ont été publiées faisant état de l'administration de doses de diazépam allant jusqu'à 400 mg par jour à des personnes, par exemple des malades schizophrènes, et ces malades n'ont jamais éprouvé de difficultés respiratoires.

A. Gjedde : Puis-je poser une question? Un des effets du MK-801 sur l'ischémie globale est un refroidissement du cerveau. D'autre part, il existe plusieurs travaux montrant que vous pouvez réduire la libération de glutamate dans des modèles d'ischémie en abaissant la température du corps et du cerveau. Serait-ce une bonne idée, dans les cas graves, de simplement abaisser la température du malade?

J. Teitelbaum : Ce traitement a été essayé dans le cas de certaines interventions chirurgicales. Ce n'est pas la première fois qu'on en parle, mais il est certain que ce traitement est assez compliqué et même plus difficile que de placer le malade en réanimation pour y recevoir du Valium par voie intraveineuse; mais c'est faisable.

Observation provenant de la salle : Je pense que l'interprétation définitive concernant la possibilité d'une prophylaxie dans ce cas est qu'elle est, somme toute, assez mince. Les données que nous avons jusqu'ici proviennent de cinq malades. La plupart des malades souffrent d'anomalie à divers degrés, en plus de leur âge qui est bien au-dessus de la moyenne. Je crois que ce qu'il faut à ce moment-ci, c'est un examen rigoureux des données fondamentales au niveau du laboratoire: il est possible que certains indices émergeront de ce travail si l'on pose les bonnes questions. Je crois que les données présentées par le Dr Novelli sur ses cultures de neurones cérébraux sont très intéressantes. Il a été signalé plus tôt ce matin qu'il y a des écarts considérables en ce qui a trait aux résultats obtenus avec les extraits de moules. Il serait peut-être bon qu'un chimiste intervienne pour en analyser la teneur en Oligo-éléments. Par exemple, le vanadium, le cuivre et le zinc sont des inhibiteurs très puissants de la Na^+K^+ATPase et d'autres mécanismes métaboliques critiques. Quelle est la concentration de ces trois métaux dans les extraits? Ce sont simplement quelques suggestions que j'aimerais faire.

I. Hynie : Je pense qu'on peut dire sans trop se tromper que l'expérience déjà acquise a été déjà très bien résumée ici et je crois qu'en l'absence du Dr Olney, il serait préférable de publier le compte rendu complet de cette discussion, plutôt que de tenter d'en faire un résumé. Je suis convaincu que les nombreuses suggestions théoriques concernant les futurs travaux de recherche seront prises en considération par le prochain groupe d'experts traitant des priorités de recherche.

23. Discussion du groupe d'experts : priorités de recherche à brève échéance

F. Iverson, C. Pinsky et J.L.C. Wright

F. Iverson : À cause de l'heure tardive, j'ai perdu la plupart de mes experts originaux. Si la chose convient à tout le monde, ce que j'aimerais faire, c'est donner un résumé des priorités de recherche qui ont été signalés durant les discussions et si quelqu'un a des objections, il n'aura qu'à me le faire savoir, je m'arrêterai et nous en discuterons. Nous venons tout juste de traiter de l'une des priorités de recherche, à savoir le traitement. Très certainement, que nous le voulions ou non, nous avons presque adopté la position confortable de dire qu'effectivement, c'est l'acide domoïque qui est la cause et qu'un certain nombre de personnes ont présenté des signes cliniques, mais que pouvons-nous faire à ce sujet? C'est un problème sérieux. Ainsi, je pense qu'il nous faut convenir que le traitement est une priorité. Carl, avez-vous quelque chose à dire sur cette question? Je sais que vous faites de la recherche dans ce domaine. Nous avons traité de la plus grande partie de cette question.

C. Pinsky : Eh bien, si on parle de priorités de recherche, deux éléments me viennent à l'esprit. L'un c'est que, quels que soient les résultats que nous avons aujourd'hui, nous avons besoin d'une source fiable d'acide domoïque dont la pureté et la puissance soient connues. Le Dr Gunner me dit que ce produit est maintenant commercialisé par une entreprise au Canada, ce qui, je crois, est une conséquence heureuse de l'épidémie, mais je me demande quel organisme pourrait veiller au contrôle de la qualité. Peut-on se fier à une entreprise ou pouvons-nous exiger des rapports de contrôle de la qualité pour chacun des échantillons, parce que dans notre laboratoire – et nombre de collègues nous ont dit aujourd'hui la même chose – nous constatons des différences entre les divers lots d'acide domoïque commercialisés et certains d'entre nous craignent d'entreprendre une expérience et d'investir beaucoup d'argent dans l'achat d'une quantité d'acide domoïque suffisante pour réaliser l'expérience, pour se rendre compte par la suite qu'on est incapable de la répéter. Il s'agit d'une priorité très simple, mais importante. L'autre priorité de recherche que je peux voir, c'est la fabrication de nouveaux médicaments et la mise à l'épreuve des médicaments existants qui n'ont pas encore été essayés, parce que lorsque nous avons demandé quel médicament était disponible, nous n'avons pas trouvé grand-chose. Je crois qu'il est possible de faire cette recherche dans presque toutes les universités. Tout le monde ici, qui travaille dans ce domaine, a un collègue qui pourrait être en mesure d'essayer la synthèse et nous avons aujourd'hui une connaissance très étendue des récepteurs des acides aminés neuroexcitateurs. Nous devrions être capables de mettre au point un médicament qui nous permette de faire deux choses : 1) bloquer l'effet toxique au niveau de certains récepteurs et 2) obtenir un effet agoniste suffisant pour préserver la fonction normale des deux synapses là où nous devons avoir des acides aminés neuroexcitateurs. C'est parce qu'ils ont une certaine fonction physiologique qu'on les retrouve dans le cerveau. Ici, je parle strictement du point de vue de la pharmacologie. Je crois que nous avons besoin d'un agoniste partiel au niveau de ces récepteurs qui permettrait de normaliser la fonction même lorsqu'il y a sur-stimulation ou sous-stimulation.

F. Iverson : Merci beaucoup. Je crois qu'il s'agit d'un point important. Nous n'avons pas eu autant d'échantillons d'acide domoïque différents que cela, mais je peux dire que l'un d'entre eux est certainement en dehors des normes. Et oui, il y a une entreprise au Canada qui commercialise ce produit.

J. Stewart : Cette entreprise s'appelle Diagnostic Chemicals. Elle est située dans le parc industriel West Royalty, dans l'Île-du-Prince-Édouard, et l'acide a été isolé de moules qui ont été récoltées au moment de la poussée. Je crois savoir que l'entreprise est consciente qu'il y a eu certaines difficultés du point de vue du contrôle de la qualité; elle procède actuellement à des contrôles beaucoup plus rigoureux de la qualité de ses produits et elle est prête à fournir de l'information sur demande.

F. Iverson : Je crois qu'hier nous cherchions également à définir le syndrome clinique et nous n'avons pas beaucoup avancé; Ivo Hynie avait proposé que l'on mette cette question comme une priorité de recherche. Je crois que c'est la seule chose que nous puissions faire avec cette question pour le moment. Je ne crois pas qu'il soit nécessaire de discuter davantage et je demanderais seulement au Dr Teitelbaum si elle aurait quelque chose à ajouter à ce qu'elle nous a dit hier.

J. Teitelbaum : Certaines tentatives pour définir le syndrome clinique m'ont paru assez bonnes. Je crois que nous devons garder les manifestations gastro-intestinales dans cette définition et bien souligner le fait que certaines personnes n'auront que ces manifestations. Pour ce qui est des manifestations neurologiques aiguës, probablement que c'est l'expression «état confusionnel aigu» qui conviendrait le mieux. La perte de mémoire ne peut être incluse dans un syndrome aigu. Vous ne pouvez vérifier ce symptôme chez un malade qui présente un état de confusion aigu. Ou bien on utilise les divers éléments qu'un tel état modifie au niveau de la conscience, les crises convulsives, les myoclonies et les mouvements anormaux, ou bien on regroupe le tout sous le vocable d'état confusionnel aigu. Personnellement, je vote pour que l'on considère ces trois catégories comme les manifestations aiguës qui peuvent être suivies ou non par des degrés variables d'amnésie. Cette question a été discutée un peu dans différents groupes. Le nom c'est une autre question.

F. Iverson : De manière générale, pensez-vous qu'il y a consensus parmi les personnes avec lesquelles vous avez discuté?

J. Teitelbaum : Je crois, oui.

F. Iverson : Avez-vous d'autres observations?

Question provenant de la salle : Nous avons eu tendance à envisager ce problème en fonction de ce que nous savons maintenant du point de vue analytique. J'imagine que d'ici un an ou deux, il existera de nombreuses méthodes d'analyse sensibles que nous pourrons appliquer au sérum et à l'urine. Peut-être que la présence de l'acide domoïque deviendra alors un critère plus important qu'il devrait probablement l'être.

J. Teitelbaum : Oh oui, je ne définissais qu'un syndrome clinique, sans faire mention de la confirmation du diagnostic par un dosage. Pour l'instant, cela semble être vraiment difficile, mais peut-être que les échantillons de selles seront utiles.

F. Iverson : Merci. On nous a dit cet après-midi qu'il était nécessaire de continuer le suivi des malades et de tenter d'obtenir une corrélation entre les aspects cliniques et anatomo-pathologiques. Combler l'écart dans certaines des études animales – par exemple, je crois que les études comportementales semblent un exemple idéal de ce qui peut être fait pour établir un lien entre les travaux sur l'animal et la situation humaine.

I. Hynie : Étant donné que Trish Perl et vous vous êtes rencontrés hier, je crois, pour mettre ces choses par écrit, je me demandais s'il serait possible de me faire parvenir une note sur votre définition du syndrome?

J. Teitelbaum : Bien entendu. J'aimerais parler du point suivant au sujet des études comportementales. La Dr Zatorre n'est pas ici, mais nous avons travaillé ensemble sur cette question. Nous nous sommes organisés pour faire ces études chez le rat, en leur injectant de l'acide domoïque et ensuite en essayant de leur faire apprendre des labyrinthes et de leur faire passer d'autres tests de la fonction neuro-psychologique. Nous avons aussi l'intention de prendre des rats ou des souris qui connaissent déjà certains labyrinthes et voir ce qui arrive à leur mémoire antérieure et à leur capacité d'apprendre des choses nouvelles. Ce travail est en cours et nous pensons qu'il s'agit d'une recherche prioritaire.

Question provenant de la salle : Là-dessus, je crois que si nous devons procéder à des études comportementales chez les rats, il nous faudra tenir compte de ce qui pour moi est une des questions qui entraînent le plus de confusion, à savoir la vitesse à laquelle l'acide domoïque traverse les membranes biologiques; et je crois qu'il faut connaître deux paramètres : l'un, qui a déjà été mentionné aujourd'hui, est la vitesse à laquelle l'acide domoïque traverse les membranes placentaires pour affecter le foetus – c'est un problème qui peut être étudié chez les animaux – et l'autre, c'est la vitesse à laquelle il traverse la barrière hémato-encéphalique. Dans les deux cas, je crois qu'il sera difficile de faire des études comportementales exactes si ces études sont fondées uniquement sur la concentration d'acide domoïque dans la circulation sanguine, sur les doses ou sur les deux, et si nous ne connaissons pas la vitesse à laquelle le produit passe dans le cerveau. Je crois qu'il s'agit là d'une quantité mesurable. Je crois que cela peut être fait rapidement et de manière précise s'il y a des sources fiables d'acide domoïque marqué. Je crois que nous pourrions mettre sur pied une équipe à Montréal qui serait très heureuse de se pencher sur cette question et c'est pourquoi j'aimerais souligner, avec insistance, qu'en plus de considérer la nécessité d'une source fiable d'acide domoïque «froid», il faudrait également envisager la possibilité d'obtenir une source fiable d'acide domoïque «chaud». À la lumière des expériences réalisées chez le singe, peut-être faudra-t-il également trouver un moyen de marquer l'acide domoïque pour faire la TP. Il y a trois ou quatre centres de TP au Canada et je crois qu'il faudrait faire un effort pour marquer l'acide domoïque pour la TP chez les singes, peut-être dans la colonie de singes qui existe à Ottawa. Je crois qu'il y a là une priorité immédiate. Je crois qu'aucune des études qui seront réalisées dans l'avenir et qui seront fondées sur la dose ou simplement sur la concentration dans le sang n'aura une grande valeur si l'on ne sait pas ce que cela nous dit sur sa pénétration dans le cerveau.

F. Iverson : Merci beaucoup. Je peux constater que tout le monde a les yeux rivés sur ma liste et je crois que je ferais aussi bien de la lire au complet. Ces priorités, je crois, sont importantes et je pense qu'elles le sont pour vous aussi. D'abord, du point de vue analytique, nous avons besoin d'une méthode qui nous permette d'utiliser des concentrations inférieures à une partie par million pour les études sur la distribution dans le sang et les tissus; nous aimerions savoir quelque chose du métabolisme. Il est certain que les études sur le métabolisme ou la distribution dans les tissus se dérouleraient beaucoup plus rapidement et beaucoup mieux si nous avions une bonne source d'acide domoïque marqué, comme vous l'avez indiqué. Vous pouvez sans doute le faire marquer au tritium dans votre cas, mais dans le nôtre le marquage, au carbone-14 serait préférable.

Observation provenant de la salle : Et aussi de l'acide domoïque marqué au carbone-13 ou au carbone-11.

F. Iverson : Bon. Nous avons tous notre spécialité et je pense aux autres travaux pharmacologiques aussi. Nous nous proposons d'aller de l'avant et d'entreprendre ce qui fondamentalement est une autre étude de tératogénicité, mais avec des quantités du produit plus importantes. Je crois que nous savons tous qu'avec un produit radiomarqué, une meilleure méthode ou les deux nous permettra d'étudier le problème de l'absorption. Ce transfert à travers l'intestin – le phénomène d'absorption qui semble être une grosse difficulté dans nombre de travaux – peut être étudié avec de meilleures méthodes; enfin, je reviendrais aux études comportementales. Pour ce qui est de la surveillance des moules pour s'assurer qu'elles ne se retrouvent pas sur le marché, je crois que nous faisons un très bon travail et que les personnes en cause devraient être félicitées.

Question provenant de la salle : J'allais seulement proposer que, dans le cadre de vos études comportementales et physiologiques, il serait peut-être intéressant d'inclure des animaux sénescents, étant donné que la plupart des malades étaient assez âgés; peut-être serait-il également possible d'inclure des animaux qui présentent les différents syndromes pré-existants qui ont été observés chez ces personnes, étant donné qu'il existe des modèles animaux pour un certain nombre d'entre eux, comme le diabète et l'hypertension etc.

F. Iverson : Il s'agit certainement là d'un point à considérer. Si cela est possible, les choses pourraient être un peu plus difficiles pour certains, mais il

s'agit certainement d'un point à considérer.

Observation provenant de la salle : Il pourrait être utile, au sujet de l'acide domoïque marqué, de déterminer quelle est la valeur de l'acide kaïnique comme indicateur de l'acide domoïque, parce que l'acide kaïnique est commercialisé depuis longtemps. On peut l'acheter sous forme marquée. Dans quelle mesure peut-on utiliser l'acide kaïnique au lieu de l'acide domoïque dans certains de ces travaux de recherche? Il faudrait l'établir.

F. Iverson : Y a-t-il d'autres commentaires sur ce point?

Commentaire provenant de la salle : Bien qu'il puisse être tentant d'utiliser le modèle de l'acide kaïnique à cause des similitudes, nous ne devrions jamais perdre de vue le fait qu'il existe des différences. Je crois que nous devrions d'abord essayer de mieux comprendre l'acide domoïque avant de passer à l'acide kaïnique.

C. Pinsky : J'aimerais faire une observation particulière sur cette question, surtout à partir des observations de Zachek et Coyle qui ont étudié cette question d'une manière approfondie. Ils ont pu déterminer que l'acide domoïque est très différent de l'acide kaïnique et, en fait, de tous les autres acides aminés neuroexcitateurs, du fait que pour un degré donné d'activité épileptique générée par une dose donnée, l'acide domoïque produira une neurotoxicité beaucoup plus élevée que tout autre acide aminé neuroexcitateur. Ainsi, je crois que devant les accidents que nous tentons d'examiner, il serait préférable de concentrer nos travaux sur l'acide domoïque. Il serait impossible d'extrapoler d'un de ces produits à l'autre.

F. Iverson : Merci, Carl, de votre mise en garde. Y a-t-il d'autres observations sur les priorités de recherche?

J. Campbell : Pour revenir sur la question des animaux sénescents, y a-t-il des restrictions quant aux espèces? Si j'en parle, c'est seulement parce qu'on m'a dit que nous avions un nombre assez élevé de singes cynomolgus sénescents dans notre propre installation de recherche. Présentent-ils un avantage particulier qui pourrait servir à la priorité dont vous parlez?

F. Iverson : Eh bien, certainement qu'ils pourraient en avoir. C'est pourquoi j'ai dit que cela pourrait créer certaines difficultés pour certains. Cela dépend de l'espèce que vous allez utiliser. Si vous avez la chance d'avoir des singes sénescents, il vaudrait peut-être la peine d'envisager leur utilisation; pour d'autres personnes, il faudra envisager l'utilisation de rats sénescents. Je pense que c'est la question temps qui vous préoccupe ici.

Observation provenant de la salle : Je crois qu'il serait extrêmement important d'établir ici quelle est la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique chez ces singes plus âgés. Nous savons qu'une des théories de la démence humaine voudrait qu'un des éléments en cause soit l'effrondrement de la barrière hémato-encéphalique causé par le vieillissement. Je crois qu'il serait très intéressant d'utiliser de l'acide domoïque marqué pour voir si la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique du singe âgé à l'acide domoïque est différente de celle d'un jeune singe. Il s'agit là d'une étude que je financerais immédiatement si j'avais de l'argent.

F. Iverson : D'autres observations?

Observation provenant de la salle : Je crois que cette priorité de recherche a été exprimée avec des mots différents, mais pour l'énoncer de manière concise, je pense que l'une des priorités serait de voir qu'est-ce qui est efficace pour prévenir les manifestations neuropathologiques et les conséquences comportementales à long terme. Quelle est la meilleure voie d'administration et jusqu'à combien de temps, après l'ingestion ou l'administration de l'acide domoïque, cela est-il efficace?

F. Iverson : Je suis d'accord. J'espère que l'une des réponses viendra des études que nous réaliserons.

Question provenant de la salle : J'espère sincèrement que, tout comme dans le cas des récepteurs de NMDA, nous trouverons dans les années à venir un antagoniste beaucoup plus sélectif et efficace dans le cas des récepteurs de l'acide kaïnique, ou de l'un ou l'autre des sous-types de récepteurs de l'acide kaïnique, parce que nous avons découvert qu'en fait, il y avait non pas un type de récepteur, mais différents sous-types de récepteurs. Ainsi, si nous voulons pouvoir entreprendre ce genre de travail, il est sûr que nous avons besoin, de manière très urgente, de plusieurs types d'antagonistes sélectifs pour ces sous-types de récepteurs.

F. Iverson : S'il n'y a pas d'autres questions, je vais tout simplement énumérer brièvement les éléments qui, d'après ma perception, seraient les principales priorités soulevées au cours de la présente discussion :

1. Trouver une source d'approvisionnement en acide domoïque pouvant servir à de nouveaux travaux. L'acide domoïque est commercialisé par Diagnostic Chemicals dont l'adresse est la suivante :
   West Royalty Industrial Park,
   Charlottetown,
   Île-du-Prince-Édouard,
   C1E 1B0
2. Préparation d'acide domoïque radiomarqué. Le marquage au carbone-14 (14C) faciliterait l'étude de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion de l'acide domoïque. On peut obtenir l'acide domoïque marqué au tritium (^{3}H) auprès de Amersham; ce produit convient à l'étude des récepteurs.
3. Mise au point d'une méthode d'analyse permettant la détermination de l'acide domoïque dans les tissus et le sang à des concentrations inférieures à 1 ppm. Les méthodes actuelles conviennent à des fins de surveillance, mais n'ont pas la sensibilité nécessaire pour les études de distribution dans les tissus. Ces méthodes seraient également nécessaires pour confirmer l'ingestion d'acide domoïque.
4. Réalisation de travaux neuro-comportementaux. L'étude des réactions visuelles et auditives aiderait à définir la neurotoxicité de l'acide domoïque.
5. Parachèvement des travaux en cours concernant l'affinité des récepteurs. Les différences entre les espèces dans l'affinité des récepteurs peuvent influer sur la neurotoxicité de l'acide domoïque.

6. Poursuite des études visant à établir l'efficacité des antidotes (antagonistes) et autres thérapies applicables aux personnes intoxiquées par l'acide domoïque.
7. Parachèvement des études de tératogénicité. Les travaux préliminaires négatifs devraient être confirmés par une étude plus approfondie.
8. Réalisation d'une étude d'exposition subaiguë *per os* chez un modèle animal approprié. L'administration de doses devrait être essayée lorsque nous aurons suffisamment d'acide domoïque à notre disposition, afin de définir la capacité de l'acide domoïque de produire des effets par suite d'une exposition prolongée à des doses faibles.
9. Établissement de la définition du syndrome clinique qui servira à décrire les malades atteints d'une intoxication par les moules.
10. Continuation du suivi des malades.
11. Parachèvement des études visant à définir les conditions spécifiques qui peuvent influer sur la toxicité, p. ex., la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, l'absorption, les lésions rénales, les lésions gastro-intestinales.